

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05900

研究課題名(和文) 蛍光指紋による環境光下での食品汚れの非破壊検知システムの開発

研究課題名(英文) Development of non-destructive detection system for food residue under ambient light using fluorescence fingerprint

研究代表者

柴田 真理朗 (Shibata, Mario)

東京海洋大学・学術研究院・准教授

研究者番号：40590360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：食品製造現場における製造機器内部や表面に残る食品由来汚れの効率的な洗浄方法の確立のためには、機器表面に付着した食品由来汚れの迅速な検知が必要である。食品由来の汚れを検知するためには、食品由来の様々な成分を網羅的、かつ迅速に検知、さらには定量化可能な手法が必要である。本研究は、本研究では、農産物・海産物・畜産物・乳製品・飲料の5つのカテゴリに属する計15種類の食品由来の汚れをステンレス板状に塗布し、蛍光指紋計測に供した。蛍光指紋によってそれらの汚れ由来(カテゴリ)と、ATPおよびタンパク質含量の推定が可能であると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、金属表面の計測において、散乱光などノイズが含まれた状態の計測であっても、成分を判別または定量することができたこと、蛍光指紋測定によって、食品由来の広範囲の汚れを迅速に検知することが可能であることである。また、社会的意義は、食品工場などにおいて必要とされる迅速な汚れ検知が可能であることが示唆された点である。

研究成果の概要(英文)：In order to establish an efficient cleaning method for food residue inside and on the surface of manufacturing equipment, rapid detection for food residues on the food-contact surface is necessary. In this study, a total of 15 food residues belonging to five categories (agricultural products, marine products, livestock products, dairy products, and beverages) were attached to a stainless steel plate and subjected to fluorescence fingerprint measurement. It was suggested that the fluorescent fingerprints could be used to estimate the origin (category) of the food residues, and to quantify ATP and protein content in the residues

研究分野：農業工学

キーワード：食品汚れ 光計測 ステンレス 多変量解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食品製造現場における製造機器内部や表面に残る食品由来汚れは、微生物の増殖さらには食中毒などを引き起こす主要因の一つであり、さらに、伝熱などの製造効率を低下させる要因でもあるため、洗浄により汚れを除去することは重要である。効率的な洗浄方法の確立のためには、機器表面に付着した食品由来汚れの迅速な検知が必要である。

現在、食品由来汚れとして代表的な物質として ATP やタンパク質が挙げられる。ATP は化学発光を利用した簡易な拭き取り測定キットも市販されている。しかしながら、ATP は食品によって含量が異なるので、ATP のみで汚れを判断するのは難しい。よって、測定対象をあえて限定せず、食品に含まれる様々な成分により汚れを検知するのが望ましいと言える。したがって、食品由来の汚れを検知するためには、食品由来の様々な成分を網羅的、かつ迅速に検知、さらには定量化可能な手法が必要である。

迅速かつ非破壊で対象を計測する手法として、光を用いた様々な手法が開発されている。その中でも近年、蛍光指紋測定が注目されている。蛍光指紋は励起波長のみならず蛍光波長も走査するので、データは励起波長×蛍光波長×蛍光強度の3次元データとなり、そのパターンは指紋のように成分特異的であり、従来の固定した蛍光波長のピーク情報だけでは判別できない微妙な成分の差異が検出可能である。また、複数成分が混在する試料の蛍光指紋は各成分の蛍光指紋の重ね合わせとなり、一度の測定で複数成分の情報を得ることが可能である。

食品に含まれる ATP、NADPH、芳香族アミノ酸、クロロフィルなどは蛍光を持つため、蛍光指紋を汚れの検知および定量に適用することで、食品由来の汚れを検知することが可能であると考えられる。しかしながら、光計測は目的の光以外の情報を遮断するために、暗環境にすることが実用展開のために大きな障害となる。実際の製造現場においては環境光を遮断することは難しい。そこで、画像処理の分野で研究されている高周波フィルタ法を用いて、蛍光と反射光を分離し、蛍光情報のみを取り出すことができれば、上記の課題は解決できると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、蛍光指紋による食品由来汚れの判別・定量モデルを開発し、次に取得した蛍光指紋データおよびモデルを基に、環境光下における食品汚れの判別・定量装置の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

3.1 実験試料

本研究では、農産物・海産物・畜産物・乳製品・飲料の5つのカテゴリに属する計15種類の食品を使用した。試料を50gをはかりとり、同量の蒸留水とともにフードプロセッサーでホモジナイズした。得られた溶液を吸引ろ過した後、遠心分離で得られた上澄液を各試料の原液の食品抽出液とした。この原液を蒸留水で希釈し、20倍、40倍、50倍、100倍の希釈液も調製した。また、脂溶性物質についてクロロフィルとビタミン類を標的物質として検知するため、トマトと緑茶の2品目について、メタノールとエタノールにより抽出を行った。食品抽出液を300μLとり、ステンレス板に塗布した。なおステンレス板はSUS304、400研磨(40mm×40mm)のものを使用した。沈殿物についてもSUS板に塗布し、それらを25℃に設定された恒温器(IN604:Yamato)内で2時間乾燥させ、実験試料とした。

3.2 計測方法

蛍光指紋測定には分光蛍光光度計 F-7100(日立ハイテックサイエンス)を使用した。装置の計測制御および散乱光などの不要な情報の削除には FL Solutions4.2(日立ハイテックサイエンス)を用いた。測定条件は、励起波長範囲は200-500nm、蛍光波長範囲は250-700nm、取得間隔は10nm、スリット幅は10nm、ホトマル電圧は400V、およびスキャンスピードは60,000nm/minとした。

蛍光指紋測定終了後、ルシパック A3(キッコーマンバイオケミファ)とルミテスターPD30(キッコーマンバイオケミファ)を用いて、ATPの拭き取り試験を行い、ATP発光量の計測を行った。さらに、抽出液中のATP、ADP、AMP、IMP、HxR(イノシン)、Hx(ヒポキサンチン)を、高速液体クロマトグラフを用いて測定した。

さらに、食品抽出液のタンパク質含量を、Protein Assay Reagent(Pierce 660nm Protein Assay Kit, Thermo Scientific)を用いて測定した。

3.3 解析方法

得られた蛍光指紋データから、FL Solutions4.2を用いて、蛍光波長より励起波長が大きい部分、散乱光部分、ノイズの多い低感度領域、の3つの領域を除去した。それらの前処理済みの蛍光指紋データを用いて、判別分析および主成分分析を行った。さらに、ATP発光量データまたはタンパク質含有量を目的変数、前処理済み蛍光指紋データを説明変数として、PLS回帰分

析を行った。判別分析およびPLA回帰分析では、データセットをキャリブレーション群とバリデーション群の2群に分けて解析した。解析ソフトには、MATLAB2020bおよびJMP11を用いた。

4. 研究成果

4.1 判別分析および主成分分析の結果

表1に、判別分析の結果を示す。5つの希釈倍率を設定し、1つの倍率につき3サンプルを用いて実験を行った。キャリブレーション群、バリデーション群における誤判別の割合は3割程度であった。カテゴリー別では、キャリブレーション群では畜産物の誤判別が多く、バリデーション群では、畜産物および農産物の誤判別が多かった。

主成分分析の結果、寄与率はそれぞれ、第一主成分が71.3%、第二主成分が14.5%、第三主成分が5.41%、第四主成分が2.68%、第五主成分が2.31%であった。図1に第1および第2主成分のスコアプロットを示す。第二主成分の正の座標上には、牛乳、えび、コーラ、トマトがプロットされており、負の座標上には、鶏肉、ヨーグルト、バターがプロットされた。牛乳、エビはトリプトファンを多く含み、コーラには、フェニルアラニンが含まれている。またトマトにはNADHが含まれており、これらの蛍光ピークに対する波長条件の第二主成分の負荷量は正の量を示した。また、鶏肉、ヨーグルト、バターなどに含まれるリボフラビンの蛍光ピークに対する波長条件の負荷量は負であった。これより、第二主成分は水溶性蛍光物質を示していると考えられた。また、第三主成分はNADH、第四主成分はトリプトファンと関係することが示唆された。

表1 判別分析の結果（上段キャリブレーション、下段バリデーションデータ）

	飲料	海産物	畜産物	乳製品	農産物
飲料	22	0	2	0	2
海産物	0	15	1	2	1
畜産物	1	0	25	1	4
乳製品	0	1	3	22	4
農産物	9	3	7	1	20

	飲料	海産物	畜産物	乳製品	農産物
飲料	12	0	3	0	0
海産物	1	5	3	0	2
畜産物	2	0	10	2	1
乳製品	0	1	2	9	3
農産物	3	0	3	1	13

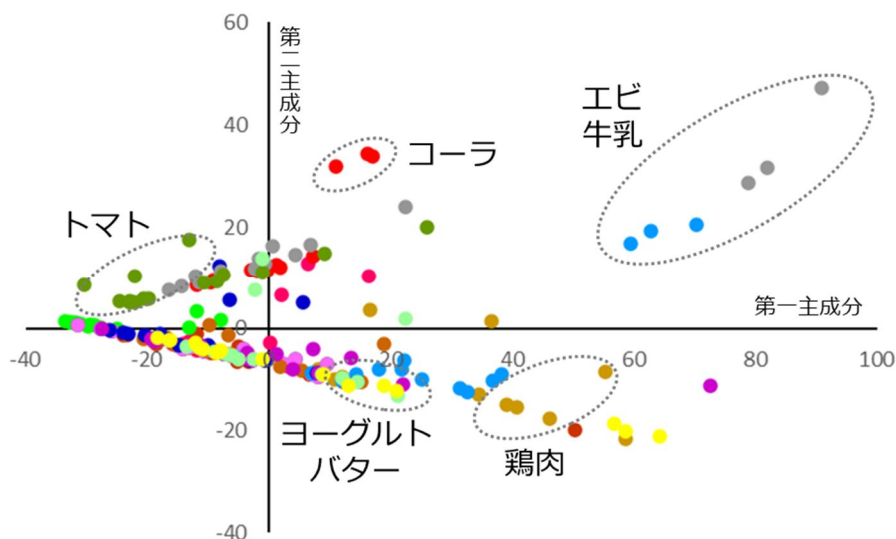


図1 第一主成分・第二主成分によるスコアプロット

4.2 PLS回帰分析結果（ATP発光量およびタンパク質含量）

波長条件の蛍光強度を説明変数、ATP 発光量を目的変数として、PLS 回帰分析による ATP 発光量推定を行った。Leave-one-out 交差検証法により、潜在変数は 12 が選択された。キャリブレーション群において、決定係数の値は 0.86、RMSE は 6.82×10^3 RLU であった。一方、バリデーション群では、決定係数の値は 0.66、RMSE は 1.05×10^4 RLU であった。本研究で使用した発光量測定装置の測定できる発光量の最大値が 999999 RLU であり、トマトやいかなどの原液は、この上限値に達していたが、もともと ATP 含有量が少ない食品を抽出して得た低濃度の食品抽出液の発光量は、100 RLU を下回るものもあった。図 2 に回帰係数のプロットを示す。励起波長 200 ~ 250 nm、蛍光波長 250 ~ 350 nm 付近にピークを確認でき、これらは、鶏肉、チロシンやフェニルアラニン遊離アミノ酸のピークと一致した。また励起波長 280 nm、蛍光波長 320 nm 付近にピークを確認でき、これは ATP をはじめとする核酸関連物質のピークと一致した。さらに励起波長 320 ~ 400 nm、蛍光波長 400 ~ 500 nm 付近にピークを確認でき、これは NADH のピークと一致した。ここから ATP 発光量の PLS 回帰分析には、遊離アミノ酸、核酸関連物質、NADH が関与していたことが示唆された。ATP 発光量では、ATP、ADP、AMP の 3 種類の核酸関連物質が標的物質であり、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニンといった遊離アミノ酸や、NADH といった物質が PLS 回帰分析に関与していたため、予測精度が下がってしまったことが考えられた。

タンパク質量を目的変数として、PLS 回帰分析によるタンパク質量推定を行った。交差検証法により、潜在変数は 12 が選択された。キャリブレーション群において、決定係数の値は 0.88、RMSE は、0.20 mg/mL であった。一方、バリデーション群では、決定係数の値は 0.80、RMSE は、0.27 mg/mL であった。本研究ではタンパク質が少ない農産物のタンパク質も定量し、比較的タンパク質量が多い畜産物や海産物、乳製品のタンパク質量も定量した。様々なタンパク質量をデータとして用いたため、予測モデルのバリデーション群の精度が高くなったのではないかと考える。また図 3 に回帰係数のプロットを示す。励起波長 200 ~ 250 nm、蛍光波長 250 ~ 350 nm 付近にピークを確認でき、これらは、鶏肉、チロシンやフェニルアラニン遊離アミノ酸のピークと一致した。ここからタンパク質の PLS 回帰分析には、遊離アミノ酸が関与していたことが示唆された。

本研究により、ステンレス板上の蛍光物質は蛍光指紋で検知が可能であり、そこで得られた蛍光指紋データから、食品汚れの分類が可能であり、またタンパク質の定量予測が可能であることが明らかとなった。

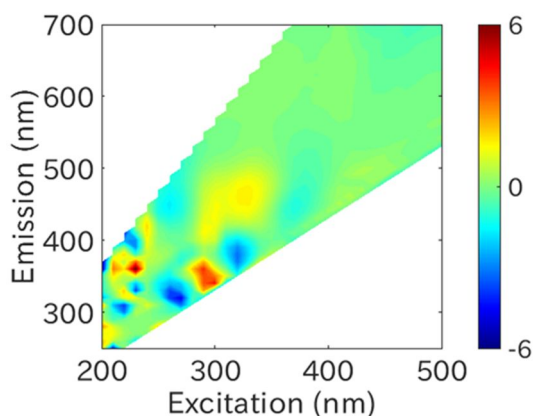


図 2 回帰係数プロット (目的変数 = ATP 発光量)

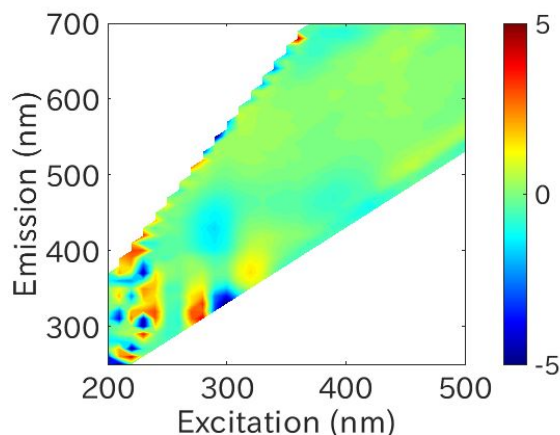


図 3 回帰係数プロット (目的変数 = タンパク質含量)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shibata Mario, Chen Jizhong, Okada Kai, Hagiwara Tomoaki	4. 巻 26
2. 論文標題 Detection of Food Residues on Stainless Steel Surfaces Using Fluorescence Fingerprint	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Food Science and Technology Research	6. 最初と最後の頁 389 ~ 397
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3136/fstr.26.389	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡田可偉、柴田真理朗、萩原知明
2. 発表標題 蛍光指紋によるステンレス板上における食品汚れの検知および定量
3. 学会等名 日本食品工学会第20回年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shibata, M., Okada, K. and Hagiwara
2. 発表標題 Measurement and analysis of food residues on surface of stainless-steel plate using fluorescence fingerprint
3. 学会等名 12th Joint International Symposium on Food Science and Technology among NUS, TUMSAT, HU, KU and ZGU
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------