

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660206

研究課題名(和文)異種スペクトル融合による仮想メタボロミクスと食品の熟成モニタリングへの応用

研究課題名(英文)Spectroscopy confusion and virtual metabolomics for food aging monitoring

研究代表者

蔦 瑞樹 (TSUTA, Mizuki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・その他部局等・研究員

研究者番号：80425553

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)：熟成期間の異なる39銘柄の泡盛を供試した。これらの試料をアルコール濃度10%に希釈し、近赤外分光スペクトル、赤外分光スペクトルおよび蛍光指紋計測に供試した。その結果、蛍光指紋を用いた場合に新酒・古酒の識別が最も精度良く行えることがわかった。また、同一試料をSPME-GCxGC-TOFMS分析に供試して得られた成分ピークデータに対して多変量解析を適用し、熟成中に変化する6つの揮発性成分を同定することができた。同様の手法をナチュラルチーズの熟度推定に適用したところ、蛍光指紋により熟成期間を精度良く推定できること、また脂質酸化物やメイラード化合物の変化が蛍光指紋に反映されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Fluorescence fingerprint (FF) measurement and multivariate analysis of Awamori samples revealed that FF could differentiate young and aged Awamori. The same samples were subjected to GCxGC-TOFMS analyses to identify 6 volatile compounds changing during aging. The same method was applied to estimate cheese maturation and FF showed high prediction accuracy for cheese maturation indices.

研究分野：食品工学

キーワード：非破壊計測 蛍光指紋 熟成

1. 研究開始当初の背景

迅速に非破壊で対象を計測する手法として、光を用いた計測は様々な分野で用いられており、食品の計測でも近赤外分光法や蛍光分光法など様々な手法が開発されている。光は計測法や波長帯によって計測可能な化学成分が異なるため、従来の光計測手法、例えば近赤外分光法のように、計測する光現象（吸収）や波長領域（近赤外）を限定した計測法では得られる情報は限られる。これでは様々な成分変化を伴う食品の熟成のような複雑な現象を捉えるには不十分である。

一方、近年、生命現象を包括的に解析・解明しようとするオミックス（-omics）研究が盛んに行われており、代表的な手法に代謝物を対象としたメタボロミクスがある。特定の代謝物に着目し計測を行う従来の手法に対し、偏りなく網羅的な計測を行うことにより、様々な代謝物の情報を得ることができ、代謝物同士の関係も特徴づけられるという利点がある。

本研究ではメタボロミクスに着想を得て、複数の分光法を組み合わせて互いの限界を補完する「異種スペクトル融合」と、それにより対象中の化学成分を非破壊でかつ網羅的に推定する「仮想メタボロミクス」手法を構想した。

2. 研究の目的

発酵食品を試料に、様々な分光法にて計測を行い、各手法で得られたスペクトルを融合する。同時に、研究協力者に依頼して同一サンプルのメタボロミクスデータを得る。両者の関係を多変量解析によりモデル化することにより、対象中の化学成分を非破壊でかつ網羅的に推定する「仮想メタボロミクス」手法を開発する。さらに、熟成度の異なる試料のメタボロミクスデータを解析し、熟成で大きく変化する「マーカー成分」を探索すると共に熟成における複雑な化学成分変化のメカニズム解明を試みる。最後に、上記の過程で得られた情報を援用しつつ、食品の熟成度を高精度かつ安定してモニタリング可能な手法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 泡盛の分光分析

熟成により複数の化学成分が変化することは知られているものの、その詳細は明らかとなっていない泡盛を実験に供試した。醸造所や熟成期間が異なる 39 点の試料につき、蛍光指紋、近赤外分光法及びラマン分光法と同様の情報が得られる赤外分光法による分析を実施した。得られたデータに対して主成分分析を適用し、醸造所や熟成期間の違いが識別可能かどうか、また可能であるならばどの分光法によるのかを検討した。

(2) 泡盛揮発性成分の網羅分析

(1) で用いた試料のうち 18 点を選択し、SPME-GCxGC-TOFMS

による網羅的香気成分分析に供試した。SPME ファイバーには DVB/CAR/PDMS、1 次カラムには Pure-WAX、2 次カラムには Rtx-5 を用いた。専用の解析ソフトウェアによってピークのデコンボリューションと NIST ライブラリーを用いた成分探索を行い、各サンプルにおいて検出された成分とその面積値からなるピークテーブルを作成した。面積値を説明変数、熟成期間を目的変数とする partial least squares (PLS) 回帰分析を行い、selectivity ratio (SR) を基準に変数を削減し、泡盛の熟成期間推定に最も寄与する成分の候補を絞り込んだ。候補成分の標準品を同一条件で分析し、保持時間及び質量スペクトルがサンプルと一致したものを熟成期間中に変化する成分と同定した。

(3) チーズの熟成度推定

熟成期間が異なる国産チェダーチーズ 15 点を実験に供試した。チーズのブロックから円柱状にサンプルを切り出し、固体測定用の石英セルに封入して蛍光指紋を計測した。得られた蛍光指紋を説明変数、熟成期間、熟度、遊離アミノ酸総量、遊離脂肪酸総量の各種熟成度指標を目的変数として PLS 回帰分析を実施した。また、熟成期間と蛍光強度の変化や、回帰に寄与する波長領域について検討を加え、熟成期間推定のメカニズムを検討した。

4. 研究成果

(1) 泡盛の分光分析

図 1 に泡盛の蛍光指紋を示す。熟成により蛍光強度が減少する波長領域（図中 a-c）と、若干ではあるが蛍光強度が増加する領域（図中 d）が観察された。また、蛍光指紋データの主成分分析を行った結果、熟成 3 年以上の古酒とそれ以外の新酒が明確に識別可能であった（図 2）。また、減圧蒸留により醸造されたサンプルは、熟成期間によらず新酒のクラスター内に位置していた。泡盛熟成中に減少することが知られている 4-vinylguaiacol の標準品を入手してその蛍光指紋を計測したところ、その蛍光ピークは泡盛サンプルにおいて新酒の蛍光強度が強い波長帯と一致した。以上のことから、泡盛の蛍光指紋計測

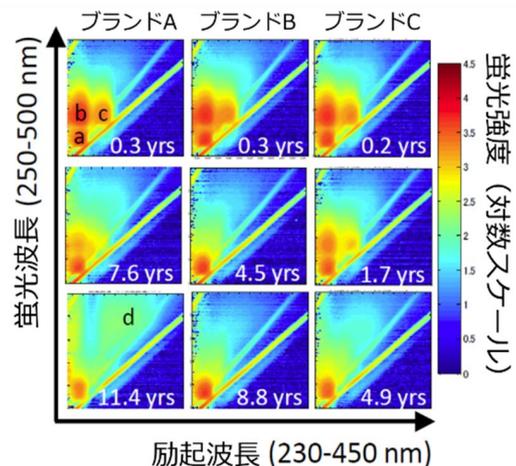


図 1 泡盛の蛍光指紋

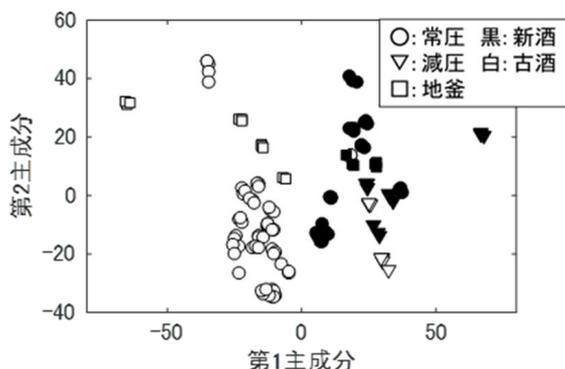


図2 泡盛蛍光指紋の主成分得点散布図

により新酒と古酒の判別が可能で、またその判別には4-vinylguaiacolの蛍光が寄与していることが示唆された。

なお、近赤外分光スペクトル、赤外分光スペクトルには、銘柄、蒸留方法、熟成期間による顕著なパターンの違いは見られなかった。

(2) 泡盛揮発性成分の網羅分析

SPME-GCxGC-TOFMS分析の結果、各サンプルにつき1次元目、2次元目の保持時間、ピーク強度の3軸よりなるクロマトグラムが得られた(図3)。クロマトグラムのデコンボリューションにより、約2300の成分ピークが検出された。PLS回帰分析とSRを基準にした変数選択により、28成分に変数を絞り込んだ場合に、熟成年数の推定精度が最も高くなることがわかった(図4)。これらの28成分は、熟成年数推定に大きく寄与する、すなわち熟成期間中に変化する候補成分と考えられた。このうち、標準試薬を入手可能な成分を同一条件で分析したところ、4-vinylguaiacolを含む7つの成分を熟成中に変化する成分として同定できた。

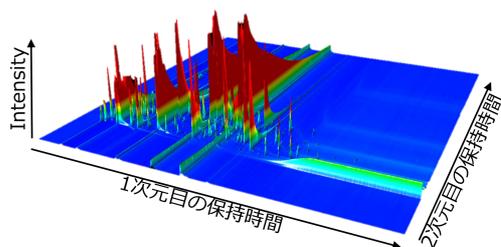


図3 泡盛のクロマトグラム

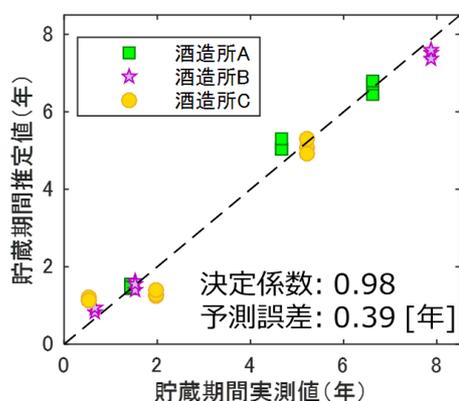


図4 揮発性成分含量による熟成年数推定

(3) チーズの熟成度推定

PLS回帰分析の結果、熟成期間、熟度、遊離アミノ酸総量、遊離脂肪酸総量のいずれも決定係数0.85以上の精度で推定可能なことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Dheni Mita Mala, Masatoshi Yoshimura, Susumu Kawasaki, Mizuki Tsuta, Mito Kokawa, Vipavee Trivittayasil, Junichi Sugiyama, Yutaka Ktamura: Fiber optics fluorescence fingerprint measurement for aerobic plate count prediction on sliced beef surface, Food Science and Technology, DOI 10.1016/j.lwt.2015.11.065(2015)

Mito Kokawa, Shoma Ikegami, Akira Chiba, Hiroshi Koishihara, Vipavee Trivittayasil, Mizuki Tsuta, Kaori Fujita, Junichi Sugiyama: Measuring cheese maturation with the fluorescence fingerprint, Food Science and Technology Research, Vol.21, No.4, p.549-555 (2015) DOI 10.3136/fstr.21.549

Vipavee Trivittayasil, Mizuki Tsuta, Mito Kokawa, Masatoshi Yoshimura, Junichi Sugiyama, Kaori Fujita, Mario Shibata: Method of determining the optimal dilution ratio for fluorescence fingerprint of food constituents, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 79 (4), pp.652-657 (2015)

Vipavee Trivittayasil, Mizuki Tsuta, Yoshinori Imamura, Tsuneo Sato, Yuji Otagiri, Akio Obata, Hiroe Ootomo, Mito Kokawa, Junichi Sugiyama, Kaori Fujita, Masatoshi Yoshimura: fluorescence fingerprint as an instrumental assessment of the sensory quality of tomato juices, Journal of the Science of Food and Agriculture, DOI 10.1002/jsfa.7199(2015.4)

蔦瑞樹、佐々木康彦、竹内郁雄、中本英樹、石川淳、川崎晋、杉山純一、藤田かおり、吉村正俊、柴田真理朗、粉川美踏：“フローサイトメトリーと多変量解析による緑茶飲料中の大腸菌数推定”日本食品工学会誌, Vol.15, No.3, pp.157-164, Sep.2014

吉村正俊、蔦瑞樹、杉山純一、笠井康、粉川美踏、藤田かおり、柴田真理朗：“光学的手法に基づく「もち米」の胴割れ検知に関する基礎的研究”農業情報研究, 23(2), 2014. 49-58

[学会発表](計5件)

蔦瑞樹、西村泰央、佐川岳人、塚原正俊：“GCxGC-TOFMSを用いた泡盛熟成中の香気成分変化に関する基礎的検討”,日本食品科学工学会第62回大会, 2015年8月29日、京都大学

蔦瑞樹, 平良英三, 塚原正俊, 塚原恵子: “蛍光指紋による泡盛の多面的な品質評価法に関する基礎研究”, 日本食品工学会第16回年次大会, 2015年8月11日、広島市立大学

Kokawa M, Ikegami S, Chiba A, Koishihara H, Sugiyama J, Tsuta M, Fujita K, Trivittayasil V: "Measuring cheese maturation by integrated use of fluorescence fingerprint and near infrared spectroscopy", International congress on engineering and food(ICEF12), 2015年6月17日、ケベック(カナダ)

Mizuki Tsuta, Masatoshi Tsukahara, Keiko Tsukahara, Eizo Taira, Mito Kokawa, Vipavee Trivittayasil, Masatoshi Yoshimura, Kaori Fujita, Junichi Sugiyama: “Fluorescence fingerprint for the rapid assessment of multiple attributes of awamori - the oldest spirits in Japan”, International congress on engineering and food(ICEF12), 2015年6月17日、ケベック(カナダ)

蔦瑞樹、平良英三、塚原正俊、塚原恵子、V.Trivittayasil、吉村正俊、藤田かおり、杉山純一: “分光法融合による泡盛の多面的かつ迅速な品質評価法に関する基礎的研究”、日本農芸化学会2015年度大会、2015年3月28日、岡山大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

蔦 瑞樹 (TSUTA, Mizuki)

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・食品分析研究領域・主任研究員

研究者番号: 80425553