

平成30年6月20日現在

機関番号：12614

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16262

研究課題名(和文) 蛍光指紋によるマグロの鮮度および熟成度の非破壊モニタリング

研究課題名(英文) Nondestructive measurement of freshness and maturity of tuna by 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・助教

研究者番号：40590360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：解凍条件または冷凍条件を変化させたメバチマグロの蛍光指紋、核酸関連物質およびアミノ酸量から鮮度または旨味の指標の予測するモデル構築を試みた。蛍光指紋データを説明変数、K値を目的変数としたモデルの構築したところ、PLS回帰分析では潜在変数8のとき、バリデーションの決定係数が0.90であった。一方、ニューラルネットワークでは、中間層や性能比などのパラメータを最適した結果、決定係数が0.97となるモデルが得られた。蛍光指紋による予測モデル構築にはニューラルネットワークが有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Predictive models for of freshness or umami from the fluorescence fingerprint, nucleic acid-related substance and amino acid contents of tuna meat (*Thunnus obesus*) were constructed by changing the thawing and freezing conditions of the samples. Fluorescence fingerprint and K-value were set as an explanatory variables and as a response variable. As a result, PLS regression analysis showed that the coefficient of determination for the validation data was 0.90 with 8 latent variables. On the other hand, by optimizing parameters such as the number of nodes in the mid layer and the performance ratio, the neural network model showed the best performance with coefficient of determination of 0.97. It is suggested that neural network may be effective for construction of predictive models from fluorescent fingerprints.

研究分野：食品工学

キーワード：蛍光指紋 非破壊計測 多変量解析 魚肉

1. 研究開始当初の背景

水産物、特に魚肉は食品の中でも、特に品質劣化が速く、そのため干物や鰹節などの中、長期保存のための加工技術が適用されてきた。近年になり、冷凍および冷蔵といったコールドチェーンが発展したため、刺身用などの鮮魚を容易にスーパーで入手できるようになったが、その魚肉に関する品質管理は十分とは言えない。その理由として個体のパラツキの大きさ、および計測技術、とりわけ非破壊で品質を計測する技術に関する研究が十分ではないということが挙げられる。

魚肉に関する非破壊評価としては、近年までは近赤外分光法を用いた脂肪量の測定例にとどまっていたが、最近は蛍光指紋法を用いて冷凍されたアジの鮮度を測定した研究例がある。魚肉の鮮度指標はいくつか提案されているが、死後に減少し始める ATP の分解生成物に着目した K 値という指標が一般的なものの一つである。具体的には ATP、ADP、AMP、イノシン酸、イノシン、ヒポキサンチンという、代謝の過程で生成する 6 つの成分から、 $K \text{ 値} = (\text{イノシン} + \text{ヒポキサンチン}) / (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP} + \text{イノシン酸} + \text{イノシン} + \text{ヒポキサンチン})$ と定義される。K 値が低いほど鮮度が高いと解釈される。

しかしながら、K 値が魚肉の品質と必ずしも対応しているわけではなく、とりわけマグロのような魚肉ではいちがいに K 値が低いほど品質が高いとは言えない。なぜならば、ATP の代謝過程で生ずるイノシン酸や、タンパク質が分解されたグルタミン産などの遊離アミノ酸は良く知られた旨味成分であるため、ある程度は代謝が進んだ方が実際に食したときおいしいのである。これは一般に熟成と呼ばれており、マグロの場合は、漁獲されたものをすぐに食べてもおいしくはない。つまり鮮度と熟成度のバランスが重要なのである。

2. 研究の目的

そこで、本研究では保存条件を様々に変えたマグロの魚肉の鮮度と熟成度に関する成分、つまり ATP に関連した核酸物質およびアミノ酸の変化を蛍光指紋によって予測するモデルを構築することで、それらを非破壊的に計測する手法を開発することを目的とした。実験 1 として、鮮度指標である核酸関連物質の複合指標 K 値を目的変数とし、PLS 回帰およびニューラルネットなどの予測モデルの検討を行った。さらに実験 2 として、鮮度に加えて旨味の指標であるアミノ酸も加えたデータで解析を行った。

3. 研究の方法

実験 1

本研究においては、メバチマグロ(冷凍・タヒチ産)の背側赤身を使用した。また、解凍及び蛍光指紋測定の際には 2×3×4 cm にカットした試料を用いた。さらに、鮮度が良い状態か

ら悪い状態までの幅広い品質を経時的に計測するために、水中解凍、氷水解凍および低温解凍を実施した。各試験区 3 つ繰り返し測定を行い、全 27 の試料を使用した。

試料の蛍光指紋を、分光蛍光光度計 (F-7000、日立ハイテクノロジーズ) を用い、励起および蛍光波長が 250-600 nm とした。試料は 2 に設定した高低温サーキュレータを接続した温調ステージ上に静置した。温調ステージは断熱のため発泡スチロールで覆い、さらに、遮光のため暗室(ミニテント)内で測定を行った。

蛍光指紋測定後、試料の光照射部位を中心に 2.5 g 採取後、0.4 M 過塩素酸水溶液 20 ml を加えホモジナイズし、遠心分離後の上澄み液 5 ml を分取し、2 M 炭酸カリウム 1 ml を加えてさらに遠心分離した。得られた上澄み液を 0.22 μm のメンブランフィルタで濾過した後、HPLC 分析に供した。HPLC 測定は高速液体クロマトグラフィー(日立ハイテクノロジーズ)を使用した。カラムは、Asahipak GS-320HQ (昭和電工) を用い、260 nm の吸収波長で定量を行った。

蛍光以外の情報を除いた蛍光指紋データはキャリブレーション群 17 サンプル(濃度推定式作成用)とバリデーション群 9 サンプル(濃度推定式検証用)の 2 群に分けた。キャリブレーション群を用いて、鮮度測定で求めた K 値を目的変数、各波長条件における蛍光強度値を説明変数として、各解凍条件の K 値の推定式を PLS 回帰分析により求めた。この時、潜在変数はキャリブレーション群中で leave-one-out cross-validation を行うことで決定した。PLS 回帰分析は予測分析ソフトウェア JMP Pro 13(SAS Institute Japan)を用いて行った。

一方、ニューラルネットワークに関しては、ニューラルネットワークのノード数を 10~500 まで 10 ずつ変化させながら、重みの初期値を乱数発生器で変化させることによって、それぞれのノード数で 100 回試行した際の平均値を求め、ノード数の最適化を行った。また、ニューラルネットワークの汎化性能を向上させるために Weight decay 正則化を行った。性能比 γ の値を 0~0.999999 で変化させ、最も γ の決定係数 R^2 値が最大になる γ を導出した。

実験 2

実験 1 と同じ種類の試料を用い、3 つの冷凍条件 (-80 で冷凍保存、-30 で冷凍保存、-20 で冷凍保存) と 3 つの解凍条件、すなわち流水解凍(18-20 ℃, 1h)、氷水解凍(0 ℃, 3h) および低温解凍(2-4 ℃, 24h) を適用した。

蛍光指紋測定、抽出液調製および核酸関連物質測定は実験 1 と同様に行った。さらに遊離アミノ酸測定は OPA 法に基づき行った。

データは全サンプル数 27 のうち、キャリブレーション群を 18、バリデーション群を 9 に分けた。キャリブレーション群を用いて、

核酸関連物質測定で求めた K 値を目的変数、各波長条件における蛍光強度値を説明変数として、各条件の K 値の推定式を PLS 回帰分析によって求めた。

4. 研究成果

実験 1

マグロの蛍光指紋データのピークはおおよそ核酸関連物質の蛍光指紋データのピークと類似した位置（励起波長 250 ~ 330 nm、蛍光波長 300 ~ 400 nm）にピークが見られることが分かり、蛍光指紋測定により、K 値の推定が可能であることを示唆している。図に PLS 回帰分析により得られた予測値と実測値のグラフを示す。この時、潜在変数は 8 と選択された。バリデーション群の決定係数が 0.90 以上であることから、あてはめは良好であった。しかし、キャリブレーション群とバリデーション群の傾きが大きく異なった。

一方、ニューラルネットワークモデルにおいて、乱数発生器を用いて重みの初期値を変化させながら 100 回繰り返し、平均値をとった結果を以下に示す。ノード数が増えるほど、バリデーション群の決定係数は低下する傾向が見られた。ノード数は 10 が最適であった。ニューラルネットワークによるモデルは PLS 回帰によるものより、決定係数はやや低かったが、バリデーション群の傾きは比較してトレーニング群に近い結果となった。

ニューラルネットワーク過学習を防ぐため、Weight decay 正則化の性能比 γ の値を 0.9999 ~ 0.999999 まで 0.000001 刻みで変化させた結果を以下に示す。決定係数 0.95 前後の高い値で推移し、 γ が 0.99998 を超えると極端に決定係数が減少することが分かった。また、 $\gamma=0.99996$ のときに決定係数は最大値を示した。この時に得られた回帰を図 5 に示す。正則化を行ったときのニューラルネットワークは極めて高い決定係数をもつことが分かった。これは、正則化がニューラルネットワークの過適合を解消し汎化性能を高め、トレーニング群とバリデーション群の乖離を防ぐことに極めて有効であることを示していると考えられる。

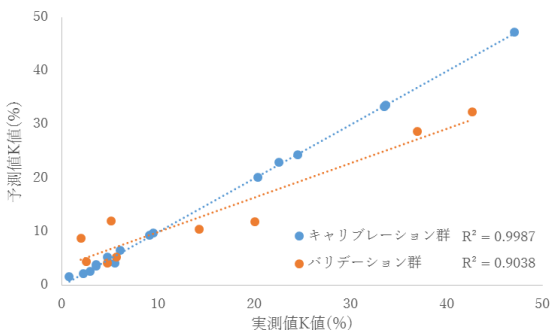


図 1 PLS 回帰分析 (潜在変数 8) による予測値と実測値の関係

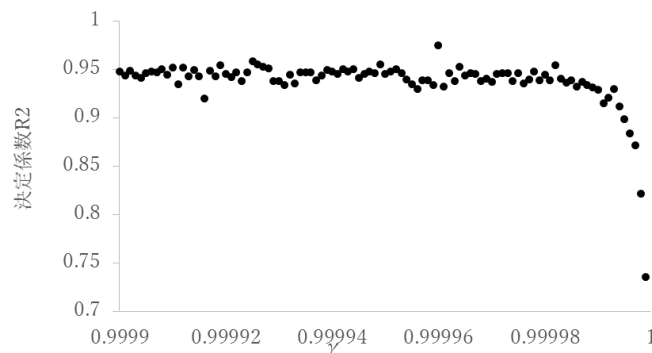


図 2 ニューラルネットワークノード数とバリデーション群決定係数 R^2 の関係

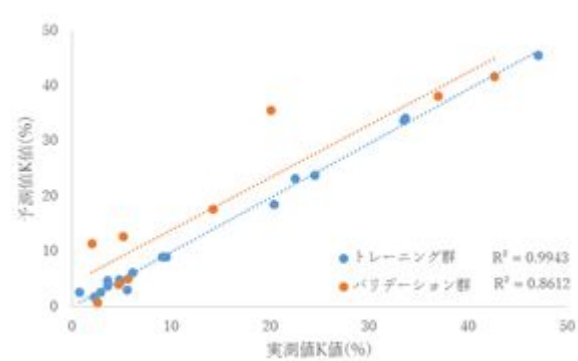


図 3 ニューラルネットワークによる K 値の予測値と実測値の関係

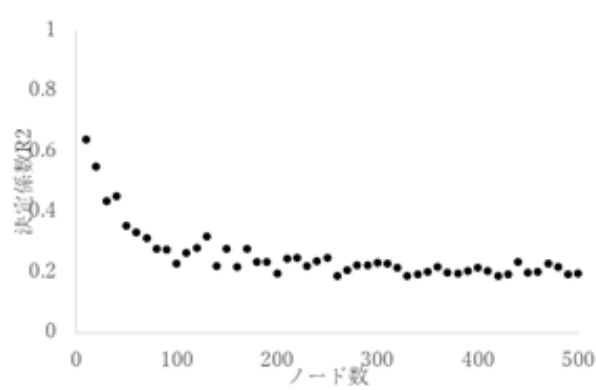


図 4 性能比 γ の値とバリデーション群の決定係数 R^2 の関係

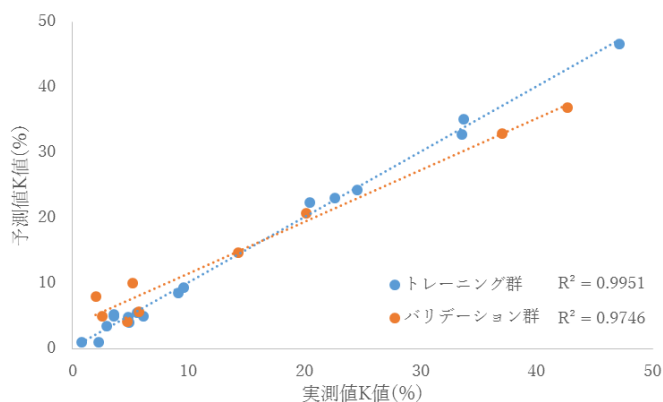


図 5 正則化済みニューラルネットワークによる K 値の予測値と実測値の関係

実験2

魚肉中の IMP 濃度はすべての核酸関連物質の中でも高く、旨味にも影響が大きい。図6に各試験区の IMP 濃度を示した。IMP 濃度は解凍法の違いでは変化が見られなかった。-20 で冷凍保存されていた試料が、他の試料よりも一番 IMP 濃度が高くなった。

本実験では魚肉の遊離アミノ酸のなかでも特に旨味に影響の大きいグルタミン酸に着目した。図7に各試験区のグルタミン酸含量を示した。各冷凍条件、解凍条件での明確な傾向が得られなかった。これは個体ごとのグルタミン酸含量の差が大きかったためであると考えられる。

蛍光指紋測定によって得られた蛍光指紋データを前処理（不要な光のデータの削除）した。波長条件の蛍光強度を説明変数、核酸関連物質測定で算出した K 値を目的変数として、PLS 回帰分析による K 値推定を行った結果、因子数3が選択された。キャリブレーションでは、 $R^2 = 0.9408$ となり、高い相関を得られたが、バリデーションでは、 $R^2 = 0.3242$ となり、相関が低い結果となった。この理由として試料数が少ない、測定した試料の K 値の幅が狭い、試料の個体差等が考えられる。しかしバリデーション結果の中には、実測値と予測値がほぼ一致するものもあり、他の試料も実測値と予測値の差は $\pm 10\%$ 程度であり、おおよその K 値を推定することは可能であると考えられる。今後、この推定式の精度を高めるためには、試料数を増やし、幅広い K 値の測定をすることが必要であると考えられる。

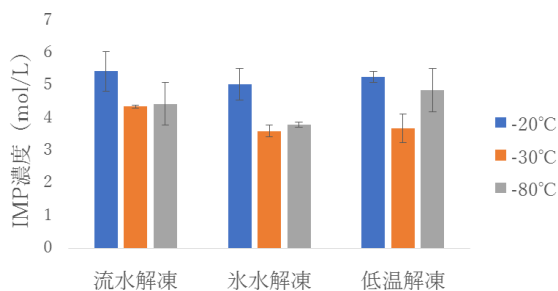


図6 IMP 濃度測定結果

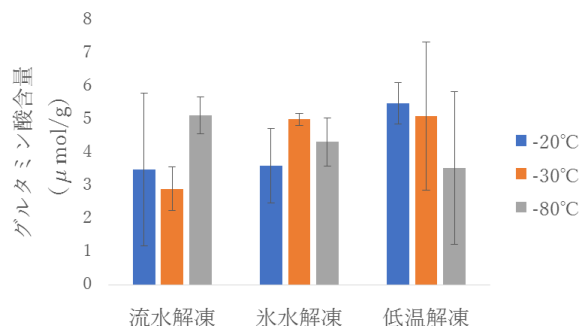


図7 グルタミン酸含量

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)

Shibata, M., ElMasry, G., Moriya, K., Rahman, M. M., Miyamoto, Y., Ito, K., Nakazawa, N., Nakauchi, S. and Okazaki, E. Smart Technique for accurate monitoring of ATP content in frozen fish fillets using fluorescence fingerprint. LWT-Food Sci. Technol., 92, pp. 258-264. (2018) 査読有
Rahman, M. M., Shibata, M., Nakazawa, N., Hagiwara, T., Osako, K. and Okazaki, E.. Effects of pH on the Fluorescence Fingerprint of ATP, Trans. JSRAE, 33(4), pp. 405-410. (2016) 査読有

〔学会発表〕(計8件)

Rahman, Md. M. Shibata, M., Nakazawa, N., Hagiwara, T., Osako, K. and Okazaki, E. Sensitivity of pH on the Fluorescence Fingerprints of Nucleotides and Aromatic Amino Acids. 日本水産学会春季大会, 東京海洋大学, 東京, 2018年3月28日
Shibata, M., Takizawa, T., Rahman, Md. M., Okazaki, E. and Hagiwara, T. Analyses of fluorescence fingerprint of frozen fish fillets for prediction of ATP Content. 2017 Joint international symposium on food science and technology, National university of Singapore, Singapore, December 7-8, (2017)

Rahman, M. M. Shibata, M., Nakazawa, N., Hagiwara, T., Osako, K. and Okazaki, E. Noninvasive sensing of initial freshness condition in frozen fish fillets using fluorescence fingerprint. The 10th Vietnam-Japan Scientific exchange meeting, Tokyo, September, (2017)

Rahman, M. M., Shibata, M., Nakazawa, N., Hagiwara, T., Osako, K. and Okazaki, E. Fluorescence Fingerprint Approach for Monitoring the Post-mortem Changes in Frozen Horse Mackerel Fillets. International symposium, Fisheries science for future generations, The Japanese society of fisheries science, Tokyo, September, (2017)
滝沢知也, 柴田真理朗, 萩原知明. ニューラルネットワークを用いた蛍光指紋測定による水産物の品質予測モデリング. 日本食品工学会第18回年次大会講演要旨集, p. 140, 関西大学, 大阪, 2017年8月9日

Rahman, Md. M. Shibata, M., Nakazawa, N., Hagiwara, T., Osako, K. and Okazaki, E.

Investigation of pH Effects on the Fluorescence Fingerprints of ATP-related Compounds. 日本水産学会春季大会, 東京海洋大学, 東京, 2017年3月28日
柴田真理朗, 久保田楓, 萩原知明. 蛍光指紋と多変量解析による魚肉の非破壊品質予測. 日本食品科学工学会第63回年次大会講演要旨集, p. 156, 名城大学, 名古屋, 2016年8月27日
Shibata, M., Kubota, K., Hagiwara, T. Development of quality estimation of tuna meat based on fluorescence fingerprint and its analysis. 日本食品工学会第17回年次大会講演要旨集, p. 56, 東京海洋大学, 東京, 2016年8月5日

()

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 真理朗 (SHIBATA, Mario)

東京海洋大学・学術研究院・助教

研究者番号 : 40590360

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者