

近赤外分光法を用いた大豆種子1粒の品質判定システムの開発

課題番号 15580230

平成15年度～平成16年度科学研究費補助金（基盤研究（C）（2））

研究成果報告書

平成17年3月

研究代表者 矢野 卓雄
(広島市立大学 情報科学部 教授)

はしがき

永年に渡り『食』に関する研究を、品質の計測や工程の管理、自動制御など食品工学的、農業工学的視点から続けてきたが、このたび文部科学省科学研究費補助金制度の御助成をいただくこととなり、格段に研究が進行した。ここにその成果をまとめることができたことは、今後の研究推進の大きな支えになると思われる。関係各位に心より感謝するところである。

『食の安全』が、量的にも質的にも脅かされている今日、国際的戦略穀物の一つである大豆もまた、量的にも質的にも十分に安全であるとは言えない状況にある。大豆消費量の大部分を輸入に頼っている我が国においては、品種、栽培地域、天候、流通保管条件等によって変化する大豆の品質を瞬時に判定し、品質に基づいた商取引を行うことは重要である。さらに、大豆を原料とするもやし、豆腐、納豆、味噌、醤油、食用油等の製造業では、安定した品質の製品を製造する加工条件を決定するための大豆品質の計測システムの開発を待望している。

このような社会情勢の中、本研究では、近赤外分光法を用いて大豆1粒ごとの生死など、大豆の質に関する情報を入手し、これらの解析結果から大豆品質を判定し、選別するシステムの開発を試みた。

本研究は、植物種子1粒ごとの種子内部の品質に関する情報を計測する点に特色があり、種子として重要な品質である生死に関する判別が可能になる。さらに、タンパク質、脂質、糖質の質に基づく品質の判定が可能となれば、品種改良の効率化、商取引の公正化などに大いに役立つ。加えて、穀物取引において劣勢にたたされている日本のような食糧輸入国では、本研究の成果が与える恩恵は計り知れないと思われる。

当方の大豆に関する研究はまだまだ続いて行く予定であるが、本報告書が関係各位の御発展にとって、何らかのお役に立てば幸いである。

平成17年3月

広島市立大学 情報科学部

教授 矢野 卓雄

研究組織

研究代表者 : 矢野 卓雄 (広島市立大学 情報科学部 教授)

交付決定額 (金額単位: 千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	1,900	0	1,900
平成16年度	800	0	800
総計	2,700		

研究発表

(1) 学会誌等

なし (投稿準備中)

(2) 口頭発表

- 1 Yayumi Fujita, Jiro Kohda, Ken-ichiro Suehara, Yasuhisa Nakano and Takuo Yano: Determination of the viability of a grain of soybean using near-infrared spectroscopy, 11th International Conference on Near Infrared Spectroscopy, Cordoba, Spain, April 6-11, 2003.
- 2 藤田八弓、香田次郎、末原憲一郎、中野靖久、矢野卓雄
近赤外分光法による大豆の生死判別システムの開発
日本食品工学会第4回年次大会、大津市 (2003年8月)
- 3 矢野卓雄、藤田八弓、末原憲一郎、香田次郎、中野靖久
近赤外分光法を用いた大豆一粒の生死の計測
平成15年度 日本生物工学会大会、熊本市 (2003年9月)
- 4 末原憲一郎、藤田八弓、香田次郎、中野靖久、矢野卓雄
NIRによる大豆1粒の生死判別
第19回非破壊計測シンポジウム、つくば市 (2003年11月)

- 5 藤田八弓、香田次郎、末原憲一郎、中野靖久、矢野卓雄
近赤外分光法を用いた大豆1粒の品質評価システムの開発
第12回計測自動制御学会中国支部学術講演会、岡山市（2003年11月）

- 6 藤田八弓、香田次郎、末原憲一郎、中野靖久、矢野卓雄
近赤外分光法を用いた大豆種子一粒の品質判定
日本食品科学工学会第51回大会、盛岡市（2004年9月）

(3) 出版物

- 1 Yayumi Fujita, Jiro Kohda, Ken-ichiro Suehara, Yasuhisa Nakano and Takuo Yano: Determination of the viability of a grain of soybean using near-infrared spectroscopy, A. M. C. Davies and A. Garrio-Varo edited, Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 11th International Conference, NIR publications, p.423-427, 2004.

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

目次

1. 緒言	1
2. 材料と方法	3
2.1 供試大豆	4
2.2 大豆品質の調整	4
2.3 大豆の近赤外反射スペクトルの測定	4
2.4 発芽率の測定	6
2.5 大豆の含水率の測定	7
2.6 ソックスレー抽出法による大豆の脱脂	7
2.7 大豆タンパク質の水抽出	7
2.8 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動	7
2.8.1 試薬	7
2.8.2 ゲルの作製	8
2.8.3 サンプルの調製	9
2.8.4 サンプルの注入	9
2.8.5 電気泳動	9
2.8.6 バンドのピーク面積の測定	9
2.9 タンパク質定量	9
2.10 大豆中のスクロース含有量の測定	9
2.11 近赤外分光法の手順	10
2.11.1 近赤外原スペクトルの測定	10
2.11.2 2次微分スペクトルの算出	11
2.11.3 シリーズの作成	11
2.11.4 ライブラリーの作成	11
2.11.5 クラスタキャリブレーション	11
3. 結果と考察	13
3.1 大豆の近赤外スペクトル	13
3.2 大豆への照射方向の違いによる近赤外スペクトルの差異	14
3.3 大豆の劣化度の違いによる近赤外スペクトルの差異	19
3.4 判別分析に用いた大豆群の発芽率	22
3.5 クラスタキャリブレーション	24
3.5.1 全波長域、6主成分因子選択	24
3.5.2 狭波長域、第1及び第2主成分選択	25

3.6	バリデーション	26
3.7	2次微分スペクトル上の差異	34
3.8	判別に有効であった波長域の帰属	39
3.9	判別に有効であった波長域と大豆中のタンパク質の変化	41
3.10	判別に有効であった波長域と大豆中の糖質の変化	44
4.	結論	51
5.	謝辞	52
6.	参考文献	52

1. 緒言

季節、品種、輸送状態や生産地などによる品質の変動が激しい農産物を原料とする食品加工プロセスにおいて、原料品質の変動は製品品質の変化として顕著に表れる。現在、食品加工の現場では、原料の状態やプロセスの製造条件などは主に職人の経験と勘により判断され調整されている。しかし、工場の機械化や大型化、それに伴う自動化をすすめるためには、職人の経験と勘に代わって原料農産物の状態を客観的に判断し、瞬時に原料の品質や加工適正が評価できることが必要である。特に、日本の伝統食品である味噌、醤油、豆腐や納豆などの原料である大豆は、流通の段階など加工現場以外にも客観的な品質評価法に対する需要は大きい。特に商取引においては、売り手側はより高く、買い手側はより安く価格を決定したいと考えるが、両者の納得のいく契約が交わされる決め手は品質であり、より客観的な評価が望まれている。

大豆は35~40%のタンパク質、約20%の脂質を含むなど栄養価が高く、畑の肉と呼ばれている農作物である。しかし、我が国の伝統食品の原料として利用されている大豆は、自給率はわずか3%ほどであり、需要のほとんどを輸入に頼っている。昨年度、日本で消費された大豆は日本産18万t、米国産385万t、ブラジル産70万t、カナダ産25万t、中国産13万tであり、米国産輸入大豆が70%以上の割合を占めている¹⁾。収穫された大豆は、生産地からトラック、貨車や船便により大規模な集荷場に集められ、船便で30~35日かけて太平洋を渡り日本に輸入される。その後、倉庫などに一時的に保管された後、商社や問屋などにより国内流通される(図1)。大豆の品質は品種などにより大きく異なるが、気候、生産地などの生育条件や、播種期、収穫期、輸送中の他品種混入や輸送中の薬剤散布など、輸送、貯蔵等の流通過程の条件にも大きく影響される。

大豆の品質評価基準の1つに大豆の発芽率があり、発芽率の測定法の1つとしてロールペーパー法がある。これは、蒸留水を含ませたキッチンペーパーに巻き込んだ大豆を、恒温器などの一定の温度に保った条件で発芽試験をし、7日後に発芽した大豆の割合を百分率で表したものである。発芽率は比較的簡単に測定できる方法であり、大豆の商取引や流通段階でよく用いられる品質評価基準である。発芽した大豆が品質の良い大豆(生きている大豆)、発芽しなかった大豆が品質の劣化した大豆(死んでいる大豆)という意味で、発芽する大豆の割合が大きい(発芽率が大きい)大豆ほど、商品として大豆の品質は高い。しかし、発芽率試験は大豆を加工する前段階での破壊分析であり、なおかつ長時間を要するため、迅速な品質評価法とは言えない。

そこで、本研究では非破壊計測システムの1つである近赤外分光法(NIR spectroscopy, Near-Infrared spectroscopy)を用い、クラスター分析による大豆の生死を判別する迅速かつ簡便な大豆品質評価法の開発を目指した。大豆品質の評価方法として、大豆の近赤外スペクトルを測定し、定性キャリブレーションの1種であるクラスター分析による判別分析を用いて、大豆の生死判別を行った。

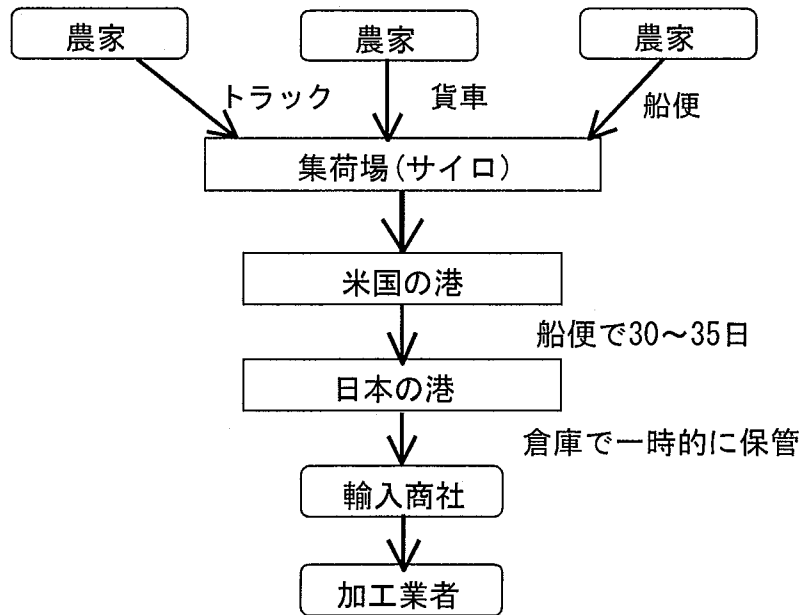


図1 米国産大豆の一般的な流通経路

2. 材料と方法

表 1 に本研究で使用したサンプル群を示す。サンプル群の名称は、サンプル群 A (発芽率 99.5%) の発芽試験によって発芽した(生きている)大豆を A99.5%Live と表した。

表 1 本研究で使用したサンプル群

サンプル群	個数 (スペクトル名)	使用目的
A99.5%Live B6%Dead	47 粒 (YF020426.1-48) 47 粒 (YF020515.1-24YF020516.1-24)	クラスターキャリブレーションの作成 (全波長域を用いた場合)
C99.5%Live D0%Dead	50 粒 (YF040216.1-50) 50 粒 (YF040329.51-100)	クラスターキャリブレーションの作成 (波長域を細分化した場合)
C99.5%Live D0%Dead E48%Live E48%Dead F65%Live F65%Dead G87%Live G87%Dead	50 粒 (YF040223.1-50) 50 粒 (YF040329.1-50) 67 粒 *注 1) 22 粒 58 粒 33 粒 89 粒 10 粒	クラスターキャリブレーションの評価 (バリデーション)
H97%Live	5 粒 (YF04122.1-5)	大豆の向きを 5 方向に変えた反射スペクトルの測定
H97% I50% J30% K10% L0%		タンパク質定量

*注 1) H48%Live : (YF021216.1-3, 5, 7, 8, 11, 12, 14, 16, 18, 20-25, 27-30, 32-38, 40, 41, 43-45, 47, 48, 50, 51, 54, 56, 59-62, 64, 67, 69, 71-80, 83-84, 86, 88-90, 93-96, 100)

H48%Dead : (YF021216.9, 10, 17, 19, 26, 31, 39, 42, 46, 49, 51, 53, 55, 63, 66, 68, 81, 85, 87, 91, 94, 99)

I65%Live : (YF030123.3-7, 9-12, 15, 16, 21, 23-25, 27-30, 32-35, 37, 42, 44-47, 50-52, 55-60, 64, 67-69, 72, 73, 78, 79, 81, 83-85, 87, 90-92, 94-96, 98)

I65%Dead : (YF030123.1, 8, 14, 17, 18, 20, 22, 26, 31, 38, 39, 40, 43, 48, 49, 53, 54, 61-63, 65, 71, 74-77, 82, 88, 89, 93, 97, 99, 100)

J87%Live : (YF030124.1, 2, 4-23, 25-28, 30, 32-41, 43-54, 56-61, 63-68, 70-79, 81-82, 84-88, 90-100)

J87%Dead : (YF030124.3, 24, 29, 42, 55, 62, 69, 80, 83, 89)

2.1 供試大豆

2001 年米国産ビントン種大豆, *Glycine max* (L.) ver. Vinton81 を使用した。実験に供するまで、冷蔵庫 (Is-5080, ADVANTEC) (温度 10°C に設定) 内に貯蔵した。

2.2 大豆品質の調整

品質の劣化した大豆を調整するため、大豆をプラスチック製のアミカゴ (幅 330 mm×235 mm×高さ 80 mm) に浅く敷き詰め、恒温恒湿器中 (相対湿度 70% 及び温度 40°C に設定) におき、貯蔵日数を変えることで様々な品質の大豆を調整した。

2.3 大豆の近赤外反射スペクトルの測定

1 粒の大豆を一粒カップに入れ (図 2)、プローブの先端が大豆の①-⑤の各方向の位置 (図 3) に触れるように、プローブの位置を固定した (図 4)。近赤外分光装置 (InfraProver II, BURAN+LUEBBE) を用いて、12 [cm⁻¹] 間隔で 4500-9996 [cm⁻¹] の範囲の大豆の反射スペクトルを測定した (図 5)。大豆サンプル群 A99.5%Live(47 粒)+B6%Dead(47 粒) はプローブの先端を①又は②のどちらか一方から当て、サンプル群 C97%Live(5 粒) は①-⑤の 5 方向から当てた。

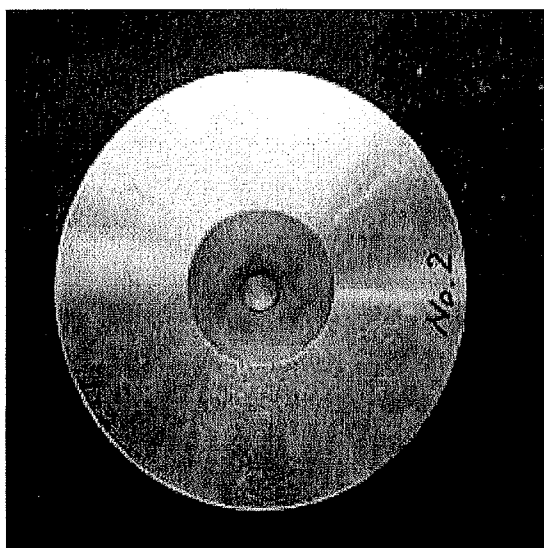


図 2 一粒カップに入れた大豆

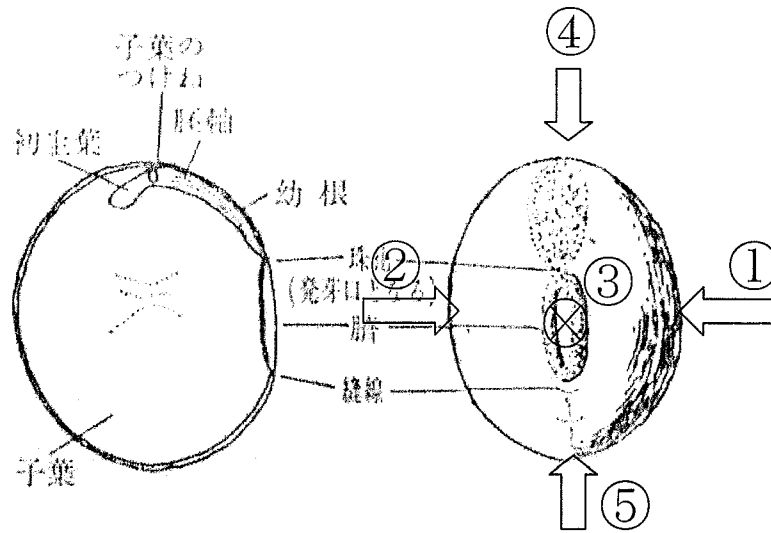


図3 大豆のプローブを当てる位置 (矢印はプローブを当てる方向)

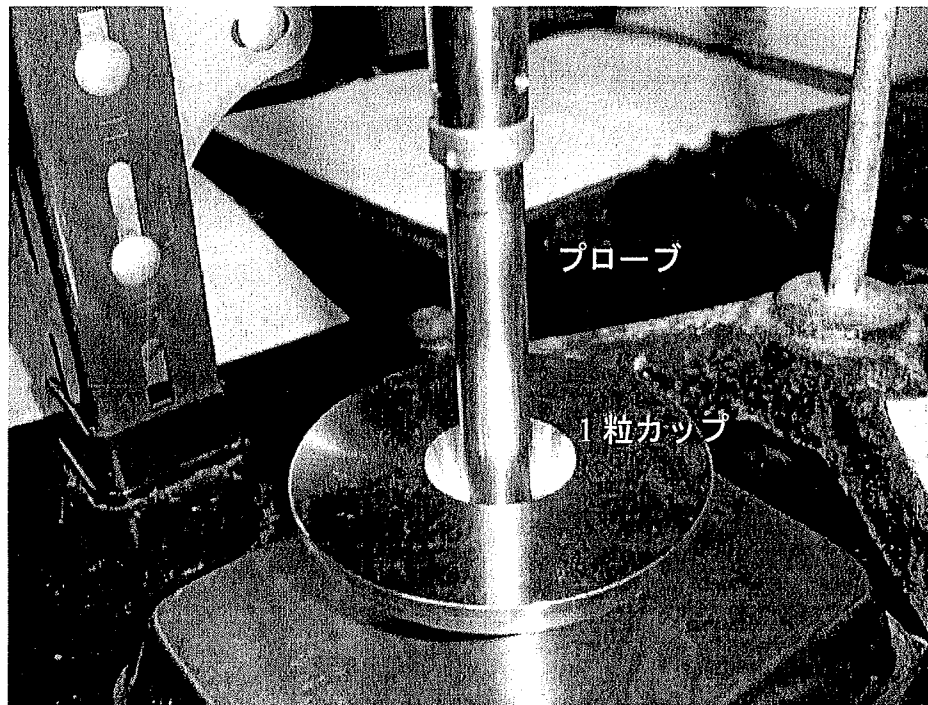


図4 NIR スペクトル測定の様子

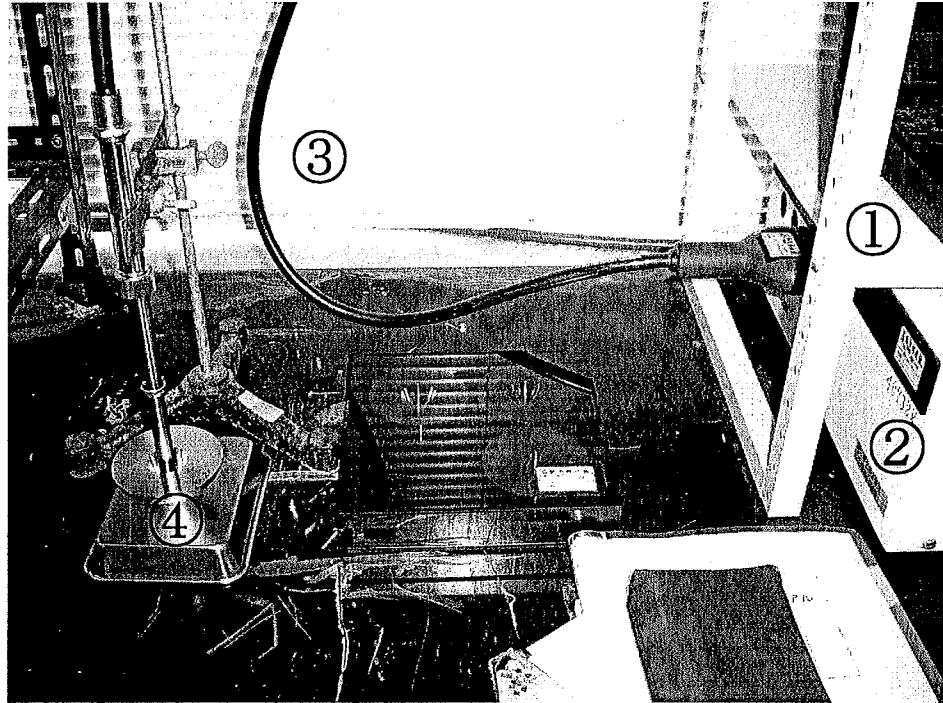


図5 測定系の構成全体写真

図5中の①はデータ取得及び解析用コンピュータであり、スペクトル測定、キャリブレーション計算及び日常分析アプリケーション設定用ツールであるソフトウェア、SESAME Ver3.0がインストールされており、近赤外分析装置の本体(②)と通信してサンプル測定の開始や測定データの受信などを行う。装置から出射された近赤外光は、③の光ファイバーを通して1粒カップ(④)の中の大豆に照射され、反射光はプローブを通して装置②に戻ってくる。プローブは2重同軸形をしており、光源からの近赤外光は外側を通して大豆に照射され、反射光は内側を通して装置に戻る。

2.4 発芽率の測定

発芽率はロールペーパー法²⁾により測定した。蒸留水を染み込ませたペーパータオルに大豆25粒(5粒5列)を並べて、一本の筒状に巻き上げた。一端を上にし、洗濯バサミを用いてステンレス金網に先端を固定し、500ml容プラスチックビーカーに立て、水分蒸発を防ぐためにプラスチック袋をかぶせた。これを25℃の恒温器(SANYO INCUBATOR MID153)内に移し、発芽試験を行った。ロールペーパーに毎日給水を行い、7日後、発芽している大豆の数を計数した。発芽した大豆の個数を発芽率試験に供した大豆総数(200~300個)で割ることで発芽率を算出した。成長した根や芽の長さが大豆の長さを超えたものを発芽したものとみなした。

2.5 大豆の含水率の測定

大豆約 19 g を Blender(Oster, mini blender)で粉末にし、赤外線水分計(Kett, moisture determination balance FD-620)を用いて含水率を測定した。2つの天秤にそれぞれ粉末大豆(約 3.5g)を乗せ、2回の測定の平均値を含水率とした。

2.6 ソックスレー抽出法による大豆の脱脂

ソックスレー抽出法を用いて大豆の脱脂を行った。抽出溶媒としてクロロフォルム：メタノール=2：1を用い、29時間抽出を行った。抽出終了後、脱脂された大豆をステンレス製トレーに移し、薄く広げ、ドラフト内で80℃、1.5時間乾燥させた。

2.7 大豆タンパク質の水抽出

脱脂大豆 1.00g に 10 倍の蒸留水 10ml をいれ、室温で 1 時間攪拌した後、遠心分離 (3000rpm、5min) し、上清を得た。更に沈殿物に 5 倍の蒸留水 5ml をいれ、室温で 1 時間攪拌した後、再び遠心分離で上清を得た。これらの 2 回水抽出した上清をあわせ、SDS-PAGE 用試料とした。

2.8 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

2.8.1 試薬

- buffer A : 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8
- buffer B : 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8
- buffer C : アクリルアミド/ビス 30%溶液 (アクリルアミド：ビス=29：1)
- 10 % SDS 水溶液
- 10 % APS 水溶液
- TEMED
- 脱色液 (20 % 酢酸)
- サンプルバッファー

サンプルバッファの組成を表 2 に示す。

表2 サンプルバッファの組成

試薬	添加量	
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	2 ml	
10 % SDS	4 ml	
2-メルカプトエタノール	1.2 ml	(使用直前に添加)
グリセロール	2 ml	
蒸留水	0.8 ml	
1 % BPB	数滴	

・ 電気泳動バッファ

電気泳動バッファ (1 l) の組成を表 3 に示す。

表3 電気泳動バッファの組成

試薬	添加量
Tris	3.03 g
グリシン	14.4 g
SDS	1.0 g

・ CBB 染色液

CBB 染色液 (500 ml) の組成を表 4 に示す。

表4 CBB染色液の組成

試薬	添加量
CBB-R250	1 g
メタノール	100 ml
酢酸	80 ml
蒸留水	320 ml

2.8.2 ゲルの作製

separation gel 及び stacking gel の組成を以下の表 5 に示す。

表 5 separation gel 及び stacking gel の組成

	separation gel		stacking gel	
	終濃度	添加量	終濃度	添加量
蒸留水	-	2.0 ml	-	2.2 ml
buffer C		2.5 ml		1.25 ml
buffer A	0.375 M	1.5 ml	-	-
buffer B	-	-	0.125 M	0.75 ml
10 % SDS	0.10%	60 μ l	0.10%	50 μ l
10 % APS	0.03%	80 μ l	0.03%	50 μ l
TEMED	0.05%	10 μ l	0.10%	10 ml

2.8.5 サンプルの調製

マイクロチューブに分子量マーカー及びサンプルを入れ、同量のサンプルバッファーを加えて攪拌し、95℃で5 min 加熱した。

2.8.6 サンプルの注入

マイクロシリンジを用いてウェルにサンプル(マーカー6 μ l 及び、各サンプル 6 μ g)を注入した。

2.8.7 電気泳動

泳動条件は、BPB の青いラインが stacking gel にさしかかるまでは 10 mA/枚で行い、それ以降は 20 mA/枚で行った。

2.8.9 バンドのピーク面積の測定

SDS-PAGE で展開したゲルをスキャナを用いて画像として取り込み、解析用ソフトウェア(Scion Image)を用いて各バンドのピーク面積を測定した。レーン全体のピーク面積に対する各ピーク面積の割合[%]で表した。

2.9 タンパク質定量

標準タンパク質として BSA を用いて検量線を作成した。サンプル群 C-G を同様に 20 μ l ずつマイクロチューブにとり、1 ml の CBB 試薬を加えて攪拌し、3 サンプルずつ用意した。そして、595.0 nm における吸光度を測定し、作製した検量線からタンパク質濃度を決定した。

2.10 大豆中のスクロース含有量の測定

粉碎大豆の含水率を測定し、乾燥大豆から熱水抽出により試料液を調整した。試料液中のスクロース濃度は、F-キット(J.K.インターナショナル)を用いた酵素法により測定した。

ミニブレンダーで粉碎した大豆粉末 3.00 g を蒸留水 30 ml の入ったビーカーに懸濁し、60℃、30 分間熱水抽出を行った。10 分おきに抽出液をかるく混ぜ、抽出中はアルミ箔でビーカーにふたをし、水分の蒸発を防いだ。抽出液を遠心分離(3000 rpm, 5 分間)し、上澄みを 250 ml のメスフラスコに移した。残った固形分と新たに蒸留水 30 cc をビーカーに戻し、60℃、10 分間熱水抽出を行った。再び抽出液を遠心分離(同条件)し、上澄みを同上メスフラスコに移した。熱水抽出を再度おこない、3 回分の抽出液の入ったメスフラスコに蒸留水を加え、250 ml にメスアップした。

2.11 近赤外分光法の手順

近赤外分光法の手順を図6に示す。サンプル群を2つに分けて、それぞれについてキャリブレーション用及びバリデーション用の2サンプル群を作成した。キャリブレーション用のサンプルを従来法による発芽率測定を行うと同時に、近赤外分光スペクトルを測定して NIR 吸光値を得た。次に、キャリブレーション用サンプル群を用いて、クラスター分析を行いクラスターキャリブレーションを作成した。クラスターキャリブレーションに使用しなかったバリデーションサンプル群を用いてクラスターキャリブレーション式を評価した。キャリブレーションの妥当性が確認できると、未知サンプルの日常分析が可能となる。

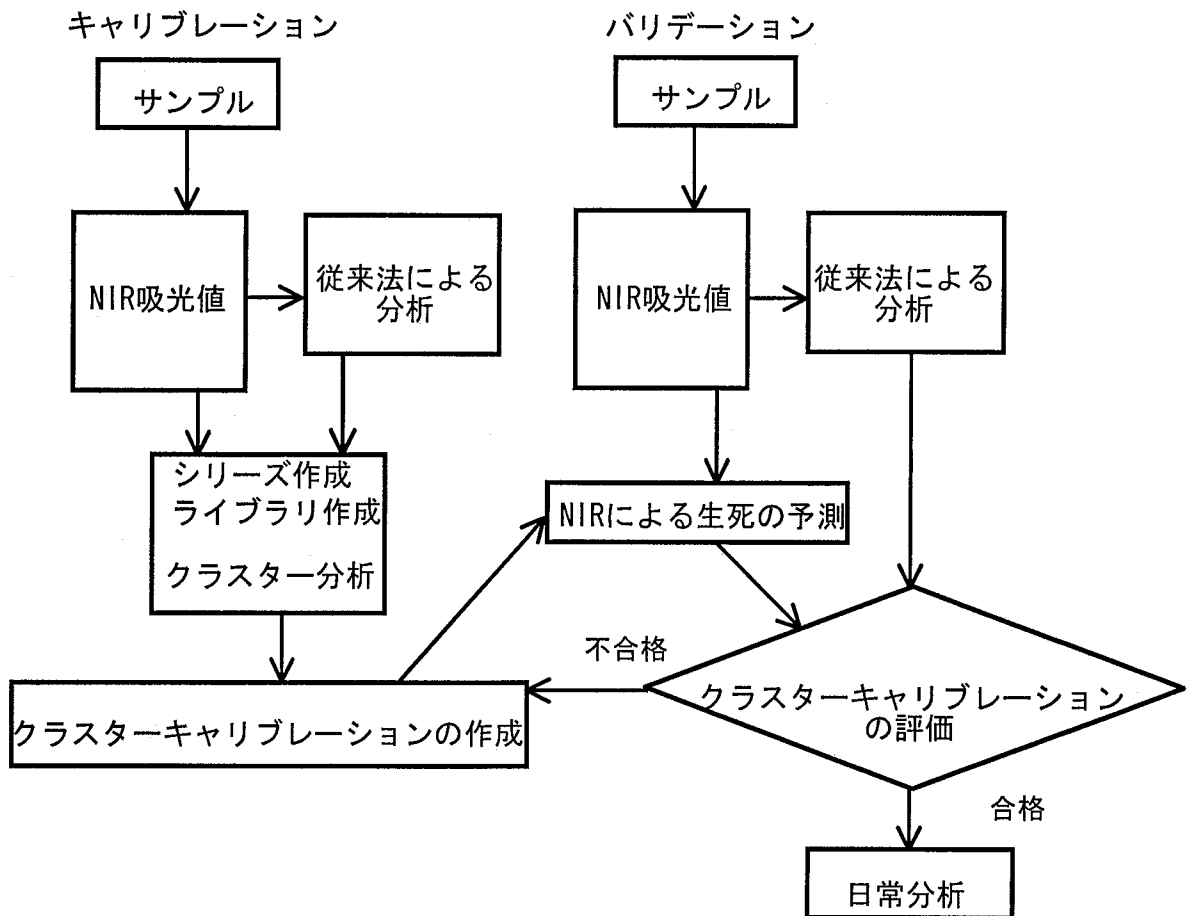


図6 近赤外分光法の手順

2.11.1 近赤外原スペクトルの測定

サンプル A、B、C 及び D はそれぞれ 200 個 (200 サンプル)、サンプル E、F 及び G はそれぞれ 100 個 (100 サンプル)、サンプル H は 5 個 (5 サンプル) の大豆の原スペクトルを測定した。

2.11.2 2次微分スペクトルの算出

大豆の原スペクトルから2次微分スペクトルを得るための計算式を(1)に示す。但し、 n = セグメント数、 m = ギャップである。

$$A = \frac{1}{2n+1} \left(\sum_{k=i+n+2m+1}^{k=i+2n+2m+2} A_k - \sum_{k=i-n}^{k=i+n} A_k \right) \quad (1)$$

本研究では $n=1$ 、 $m=0$ とした。

2.11.3 シリーズの作成

新しいシリーズを作成し、測定した近赤外スペクトルについて、発芽した大豆、発芽しなかった大豆のスペクトルにそれぞれ分けた。

新しいシリーズ名	シリーズの内容
040216livebean, 040223livebean :	サンプル C の大豆スペクトル群のうち、発芽試験によって発芽した大豆のスペクトル群
040329deadbean :	サンプル D の大豆スペクトル群のうち、発芽試験によって発芽しなかった大豆のスペクトル群

2.11.4 ライブラリーの作成

新しいライブラリーを作成し、作成したシリーズの内、判別に使用するシリーズをライブラリーにコピーした。ライブラリーとは、定性アプリケーションであるクラスターキャリブレーションに必要で、特定のシリーズ群から成るものである。判別するクラスごとに1シリーズが必要となっている。

新しいライブラリー名	含まれているシリーズ群
040216,23 & 040329bean :	040216livebean, 040223livebean, 040329deadbean

2.11.5 クラスターキャリブレーション

二次微分スペクトルについてクラスターキャリブレーションを実施した。

主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) を用いて、マトリックスを作成し、

平均スペクトル間の変動を最もうまく記述する因子（主成分）セットを計算して、スペクトル情報を秩序付けし直した。

3. 結果と考察

3.1 大豆の近赤外スペクトル

測定した大豆サンプル群 A99.5%Live の 1 粒の近赤外反射スペクトル(Y 軸：左側)及び大豆油の近赤外スペクトル³⁾ (Y 軸：右側) を図 7 に示す。

大豆 1 粒の反射スペクトル及び大豆油のスペクトル上に、大豆の主要な成分である水、タンパク質(ペプチド結合)、油に由来する波長域を示している。大豆 1 粒の反射スペクトル上にみられる主なピークは、1204、1483、1701、1715、1788、1938、2104、2165、2277 及び 2334 [nm]である。

1483 及び 1938 [nm] は水に由来すると思われる。既知の帰属表⁴⁾によると、水に由来する波長域は 760、970、1190、1450 及び 1940 [nm]である。1450、970 及び 760 [nm]の波長域は、それぞれ O-H の伸縮振動の第 1 倍音、第 2 倍音及び第 3 倍音である。1190 及び 1940 [nm]の波長域は、O-H の伸縮振動及び変角振動の結合音である。

1715、1788、2165、2277 及び 2334 [nm] は、油に由来する波長域の可能性があり、大豆油及び脂肪の主な近赤外領域における吸収は、C-H の長鎖脂肪酸の一部に由来するものである。1200 [nm]は CH₂ の第 2 倍音、1734 及び 1765 [nm]は CH₂ の第 1 倍音、2310 及び 2347 [nm]は CH₂ の伸縮振動及び変角振動の結合音である。1204 [nm] は水と油の両方に由来する波長域の可能性がある。

タンパク質の近赤外領域における吸収は、主に中赤外領域で生じる C-H、N-H、O-H に由来する基準振動の倍音及び結合音によるものである。山下ら⁵⁾によると、NIR でのタンパク質由来は 2170 nm であり、この吸収波長はペプチド結合に帰属され、塩類、糖類、アミノ酸が存在した場合も、pH が変化した場合も有意な影響を受けない安定な測定波長である。また、その他各種非ペプチド及び非タンパク質窒素化合物の吸収とも重ならないという。

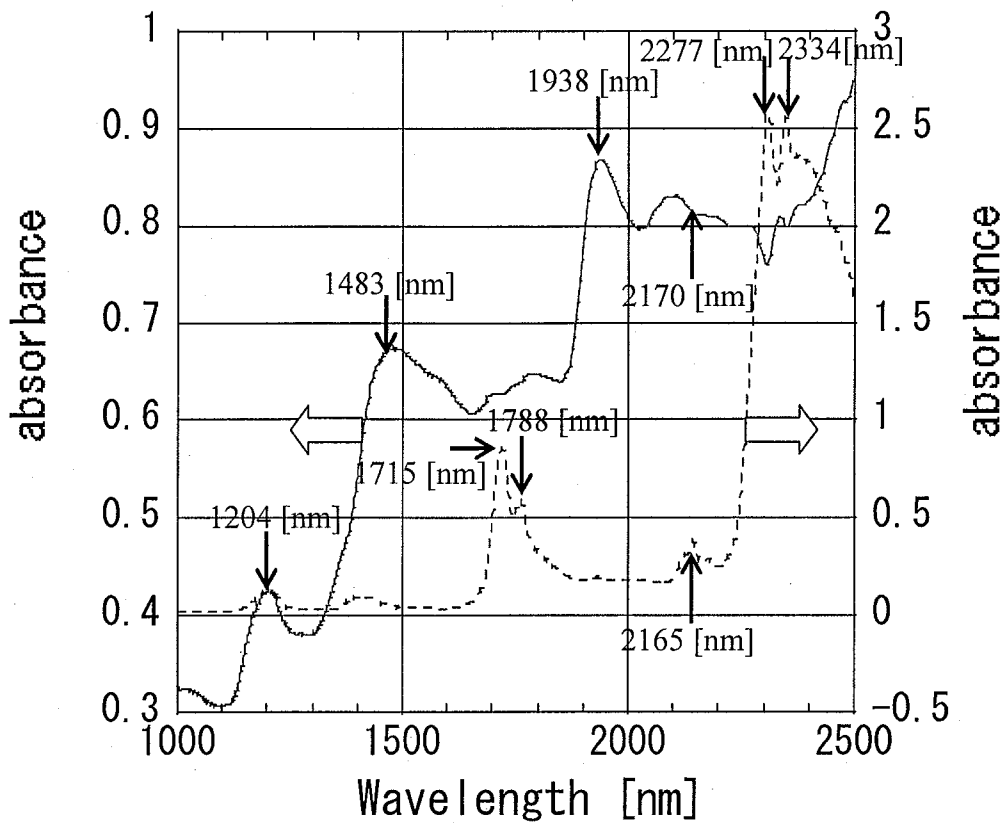


図7 大豆の反射原スペクトル及び大豆油の透過原スペクトル
 ——大豆スペクトル - - -大豆油

3.2 大豆への照射方向の違いによる近赤外スペクトルの差異

プローブの先端を図3-①-⑤の5方向からそれぞれ当てた5粒(サンプルa、b、c、d、e)の大豆サンプル群C97%Liveの反射スペクトルを図8-12に示す。

図8、図10、図11及び図12の大豆サンプルa、c、d及びeの反射スペクトルにおいて、④及び⑤方向からプローブを当てて測定したスペクトルの吸光度が高く、③方向から測定したスペクトルの吸光度は低かった。図9の大豆サンプルbの反射スペクトルにおいて、⑤方向からプローブを当てて測定したスペクトルの吸光度が最も高く、続いて④方向だった。対して①方向から測定したスペクトルの吸光度が最も低かった。大豆の④方向は胚軸、幼根及び初生葉があり、大豆が成長する為に必要な水、脂肪酸、糖、などが多く含まれており、吸光度が高くなったと予想することもできる。また、⑤方向も④方向と同様に、水、脂肪酸、糖などが多く含まれており、高い吸光度を示したものと

考えられる。しかし、大豆を透過反射した光を計測しているので、大豆中の透過距離の差異による吸光度値の変化とも考えられる。

いずれにしても、原スペクトルを判別分析に使用することには不都合が生じるため、スペクトルの前処理が必要である。

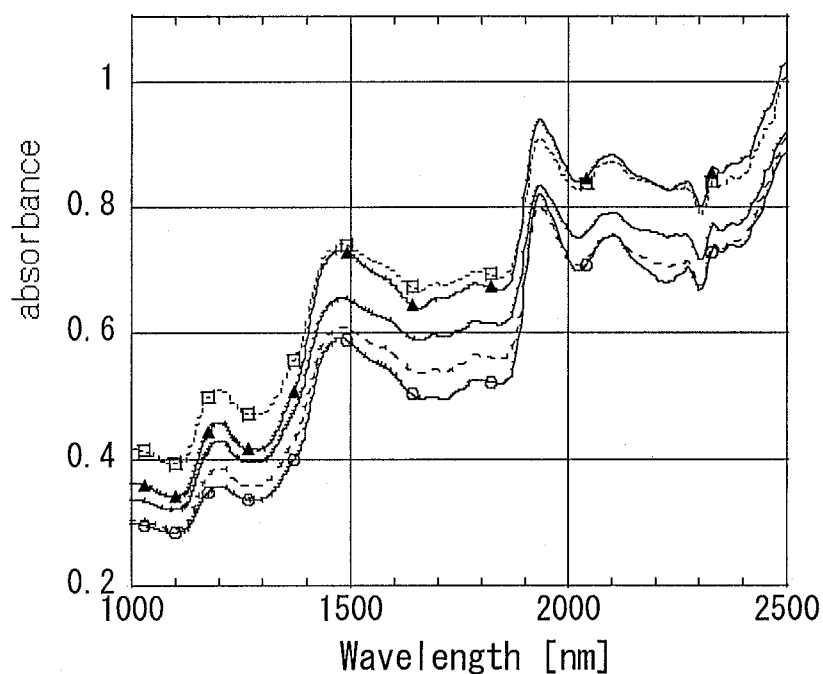
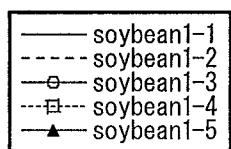


図8 大豆サンプルaの反射スペクトル



soybean1-1 : ①方向から測定した a サンプルの soybean
soybean1-2 : ②方向から測定した a サンプルの soybean
soybean1-3 : ③方向から測定した a サンプルの soybean
soybean1-4 : ④方向から測定した a サンプルの soybean
soybean1-5 : ⑤方向から測定した a サンプルの soybean

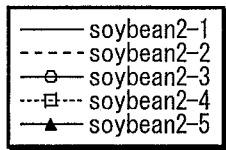
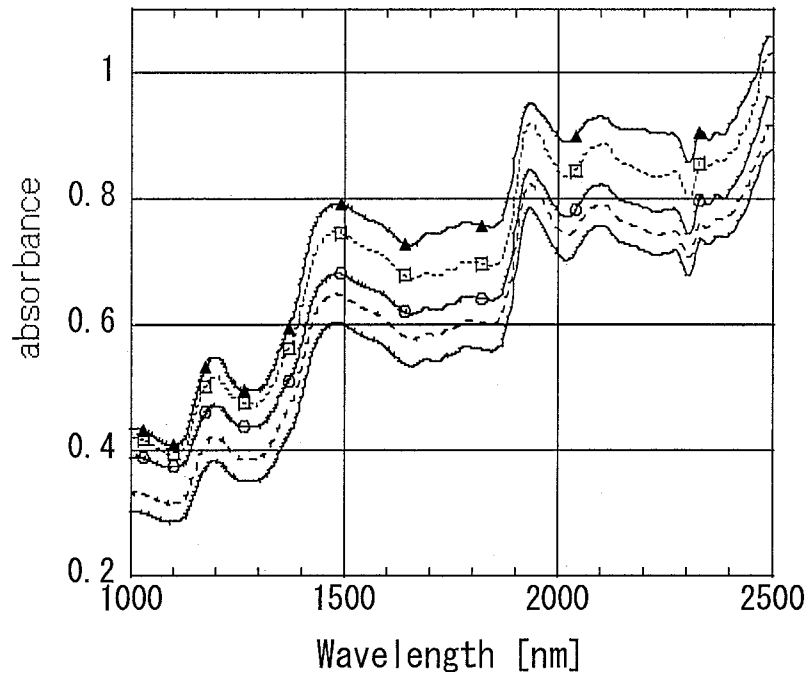


図9 大豆サンプルbの反射スペクトル

Soybean2-1 : ①方向から測定したbサンプルのsoybean
 Soybean2-2 : ②方向から測定したbサンプルのsoybean
 Soybean2-3 : ③方向から測定したbサンプルのsoybean
 Soybean2-4 : ④方向から測定したbサンプルのsoybean
 Soybean2-5 : ⑤方向から測定したbサンプルのsoybean

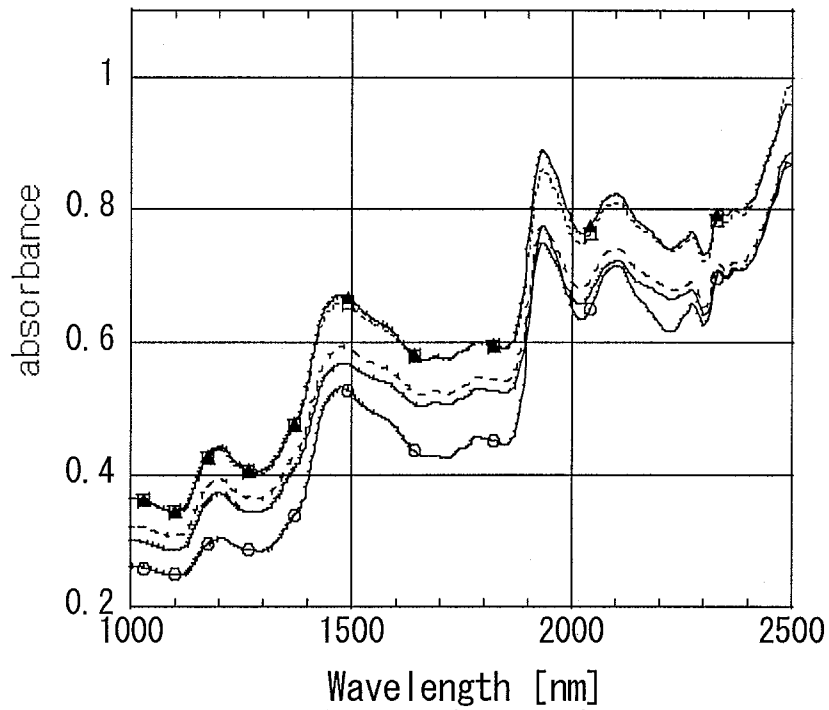
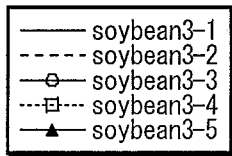


図 10 大豆サンプル c の反射スペクトル



- Soybean3-1 : ①方向から測定した c サンプルの soybean
- Soybean3-2 : ②方向から測定した c サンプルの soybean
- Soybean3-3 : ③方向から測定した c サンプルの soybean
- Soybean3-4 : ④方向から測定した c サンプルの soybean
- Soybean3-5 : ⑤方向から測定した c サンプルの soybean

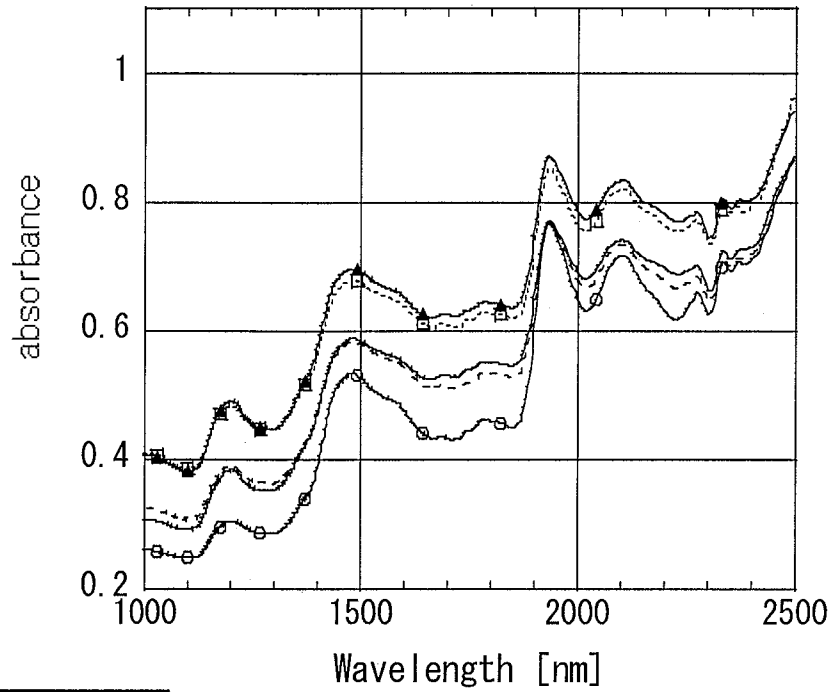
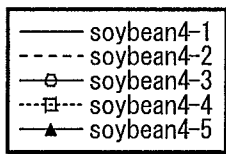


図 11 大豆サンプル d の反射スペクトル



Soybean4-1 : ①方向から測定した d サンプルの soybean
 Soybean4-2 : ②方向から測定した d サンプルの soybean
 Soybean4-3 : ③方向から測定した d サンプルの soybean
 Soybean4-4 : ④方向から測定した d サンプルの soybean
 Soybean4-5 : ⑤方向から測定した d サンプルの soybean

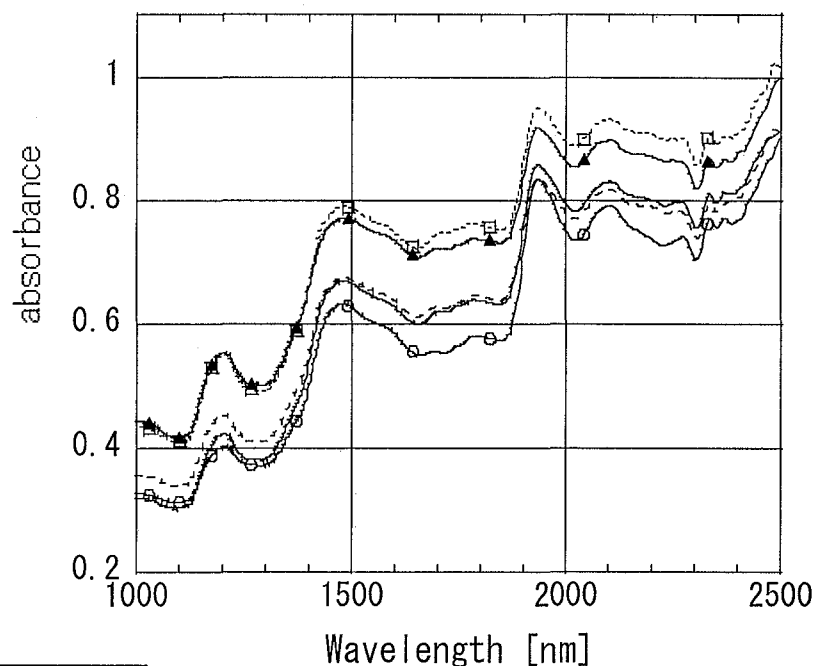
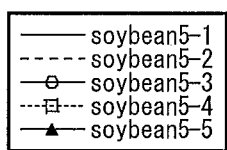


図 12 大豆サンプル e の反射スペクトル



Soybean5-1 : ①方向から測定した e サンプルの soybean
 Soybean5-2 : ②方向から測定した e サンプルの soybean
 Soybean5-3 : ③方向から測定した e サンプルの soybean
 Soybean5-4 : ④方向から測定した e サンプルの soybean
 Soybean5-5 : ⑤方向から測定した e サンプルの soybean

3.3 大豆の劣化度の違いによる近赤外スペクトルの差異

劣化日数が 0, 3, 5, 7 日の大豆について、各 30 粒の原スペクトルの平均値を図 13 に、その二次微分スペクトルを図 14 に示す。なお、各大豆群の発芽率と含水率は、それぞれ 98, 48, 28, 12%, 各大豆群の含水率は、それぞれ 15.20, 12.50, 11.45, 11.35% であった。

図 13 より、各試料群の近赤外原スペクトルは、劣化が進むにつれて吸光度が減少している。この減少の原因を調べるため、吸光度と含水率の関係に注目した。図 15 と 16 は吸光度と含水率の関係をあらわしたものである。図 15 は水の吸収波長における両者の相関であり、回帰直線はほぼ平行に並んでいる。図 16 は、水、たんぱく質、脂質、糖質に帰属しない吸収波長における相関であり、水の吸収波長の場合と同様の結果が得

られた。よって、図 13 において劣化日数にともなう吸光度の減少は、劣化に伴う大豆成分の変化を表しているのではなく、大豆の含水率の低下によるものと考えられる。

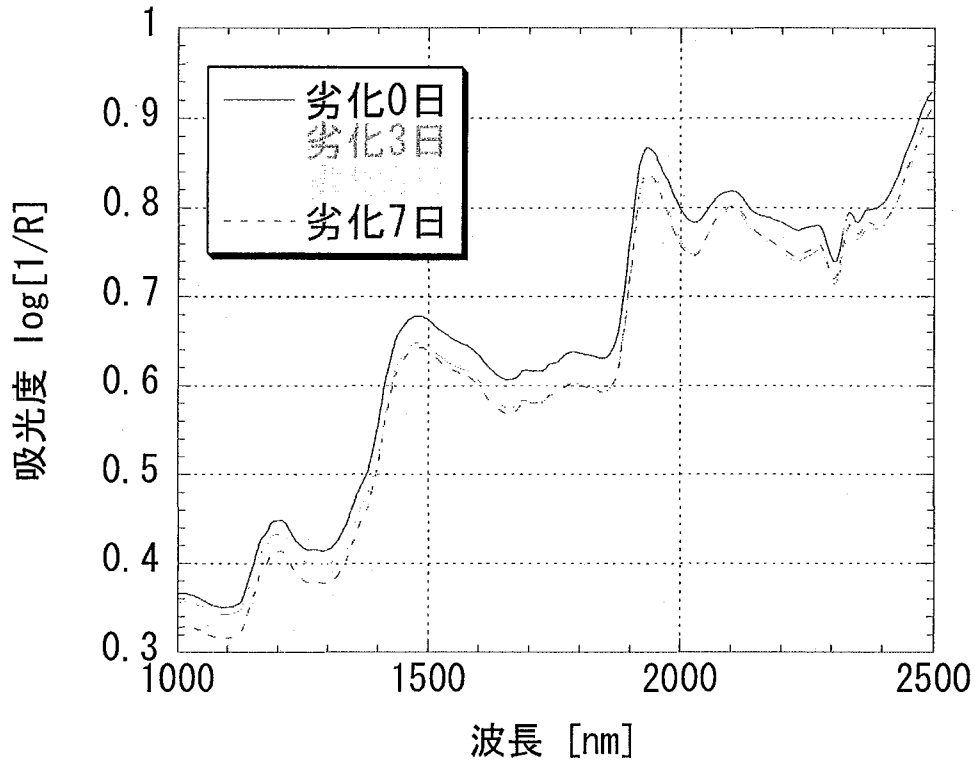


図 13 大豆の近赤外原スペクトル

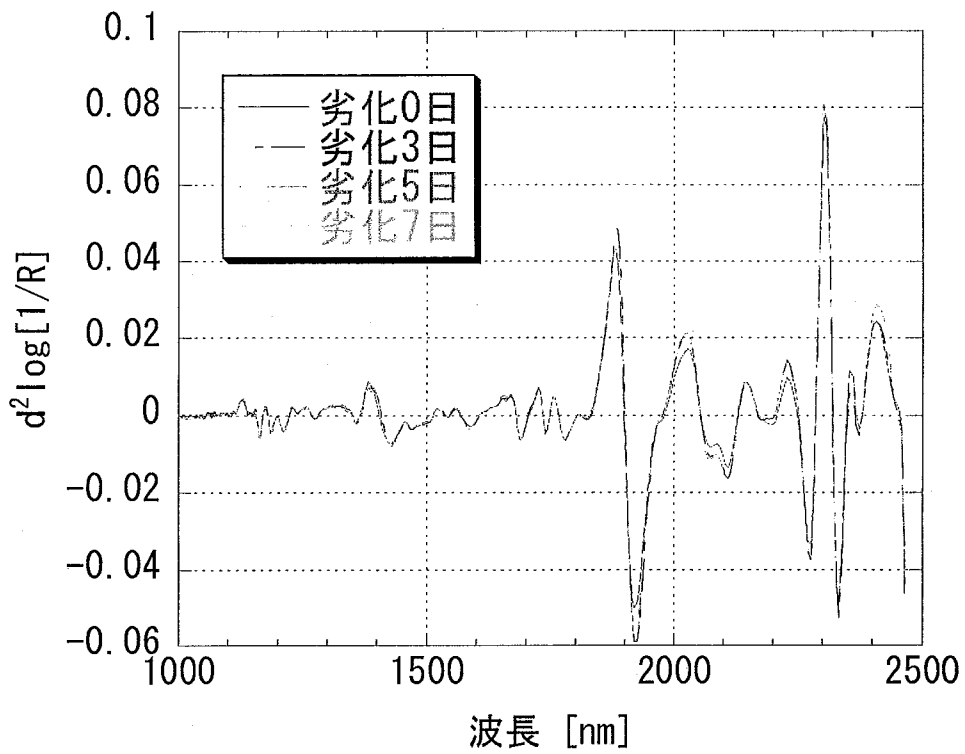


図 14 大豆の近赤外二次微分スペクトル

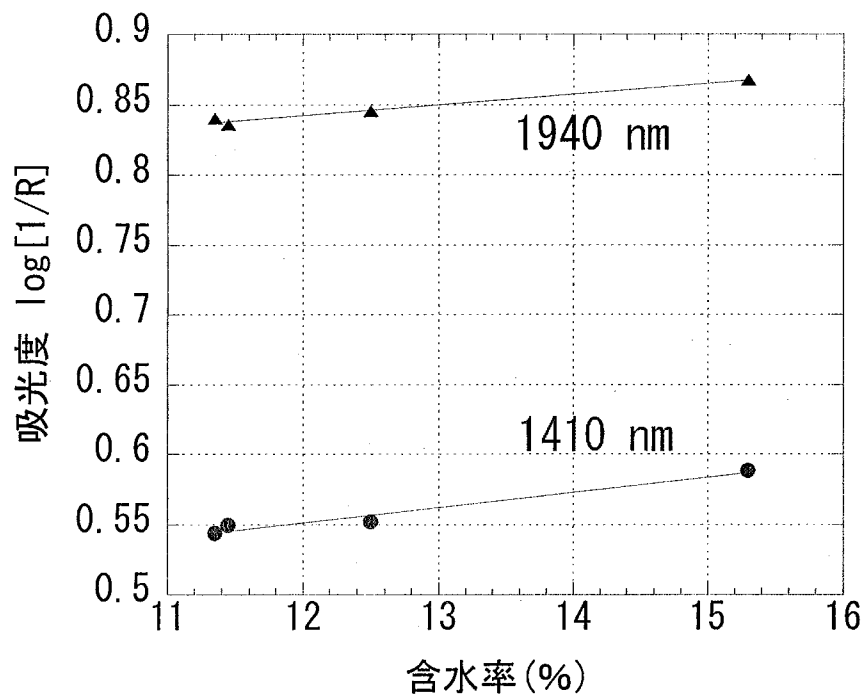


図 15 1410, 1940 [nm]における大豆の吸光度と含水率の関係

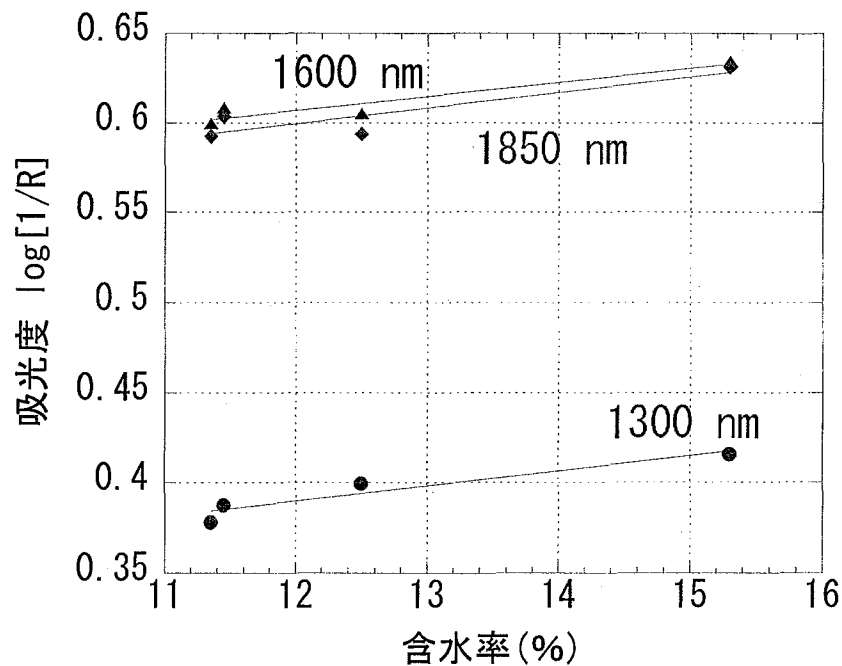


図 16 1300, 1600, 1850 [nm]における大豆の吸光度と含水率の関係

3.4 判別分析に用いた大豆群の発芽率

本研究で行った発芽率試験に供した大豆のうち、スペクトルを測定した大豆の個数を表 6 に示した。

大豆試料群のサンプル A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K 及び L における発芽率の測定結果を表 7 に示した。大豆の長さより長く発芽した大豆(生)、全く発芽してない大豆(死)の個数及びカウント外(大豆の長さより短く発芽して、品質劣化した大豆か発芽試験の期間が短かっただけなのか分からない大豆)を測定した。また、恒温器(温度 40°C、湿度 70%)を用いた大豆の劣化日数を示した。サンプル A、C 及び H は保存状態の良い大豆であり、サンプル B はサンプル A を急速劣化法により劣化させたものである。サンプル D はサンプル C を急速劣化法により劣化させたものである。また、サンプル E-G は温度 40°C で湿度 70% の条件下にサンプル A を置いて劣化させた大豆であり、サンプル H-L は温度 40°C で湿度 70% の条件下にサンプル C を置いて劣化させた大豆である。

表 6 発芽率と大豆の個数の関係

サンプル群	スペクトル測定＋発芽試験	発芽試験のみ
サンプル群 A	200 粒	なし
サンプル群 B	200 粒	なし
サンプル群 C	200 粒	なし
サンプル群 D	200 粒	なし
サンプル群 E	100 粒	300 粒
サンプル群 F	100 粒	200 粒
サンプル群 G	100 粒	200 粒
サンプル群 H	5 粒	200 粒
サンプル群 I	なし	200 粒
サンプル群 J	なし	200 粒
サンプル群 K	なし	200 粒
サンプル群 L	なし	200 粒

表 7 発芽率測定結果

サンプル群	発芽率測定結果	大豆の個数			劣化日数
		生	死	カウント外	
サンプル群 A	99.5%	199 粒	1 粒	0 粒	0 日
サンプル群 B	6%	12 粒	177 粒	11 粒	予め劣化されていた大豆
サンプル群 C	99.5%	199 粒	1 粒	0 粒	0 日
サンプル群 D	0%	0 粒	200 粒	0 粒	36 日
サンプル群 E	48%	192 粒	158 粒	50 粒	5 日
サンプル群 F	65%	195 粒	86 粒	21 粒	6 日
サンプル群 G	87%	261 粒	24 粒	15 粒	2 日
サンプル群 H	97%	191 粒	6 粒	3 粒	0 日
サンプル群 I	50%	168 粒	85 粒	32 粒	3 日
サンプル群 J	30%	47 粒	120 粒	33 粒	5 日
サンプル群 K	10%	16 粒	142 粒	42 粒	7 日
サンプル群 L	0%	0 粒	200 粒	0 粒	35 日

カウント外：生死の判定が困難であった大豆

3.5 クラスタークャリブレーション

3.5.1 全波長域、6主成分因子選択

発芽率 99.5%の発芽した大豆 (47 個) と発芽率 6%の発芽しなかった大豆 (47 個) を合わせて 1つのサンプル群 (A+B) を作り、全波長域を用いて、それぞれの 6 主成分因子におけるファクターと (表 8)、選択した主成分因子と大豆の生と死におけるクラスの数 (表 9) を示した。

表 8 サンプル群 (A+B) の 6 主成分因子の主成分得点

主成分因子	1	2	3	4	5	6
ファクター	53	31	19	43	44	50

表 9 サンプル群 (A+B)の主成分因子とクラスの数

選択した主成分因子	判別できたクラスの数	
	生	死
3	15	12
2、3	1	1
2、3、4	2	2

一般的に因子のファクターが低いほどサンプルをそのクラスにグループ分け (クラスタ化) する能力は高くなる。表 8 の 6 主成分において、第 3 主成分のファクターが 19 と最も低い、表 9 の主成分因子と生と死におけるクラスの数を見ると、第 3 主成分のみを選択した場合の判別できたクラスの数、生及び死でそれぞれ 15 及び 12 となり、十分な判別はできていない。しかし、第 2 及び第 3 主成分因子を用いた結果、生及び死のクラス数がそれぞれ 1 となり明確な生死判別ができた。

主成分 2 及び 3 をそれぞれ横軸及び縦軸にプロットした判別図を図 17 に示す。サンプル群 (A+B) においては、発芽した大豆 (生) としなかった大豆 (死) が、2 次元上で明確に判別されることが示された。すなわち、高品質の大豆と劣化した大豆の近赤外スペクトルは、明らかに違いが見られると考えられる。しかし、全波長域を用いて主成分分析を行い、全スペクトルの情報を圧縮 (主成分得点数を 6 に集約し、その中から 2 及び 3 の主成分因子を選択した) しているため、判別にどの波長域の吸収スペクトルが選ばれているかは不明である。

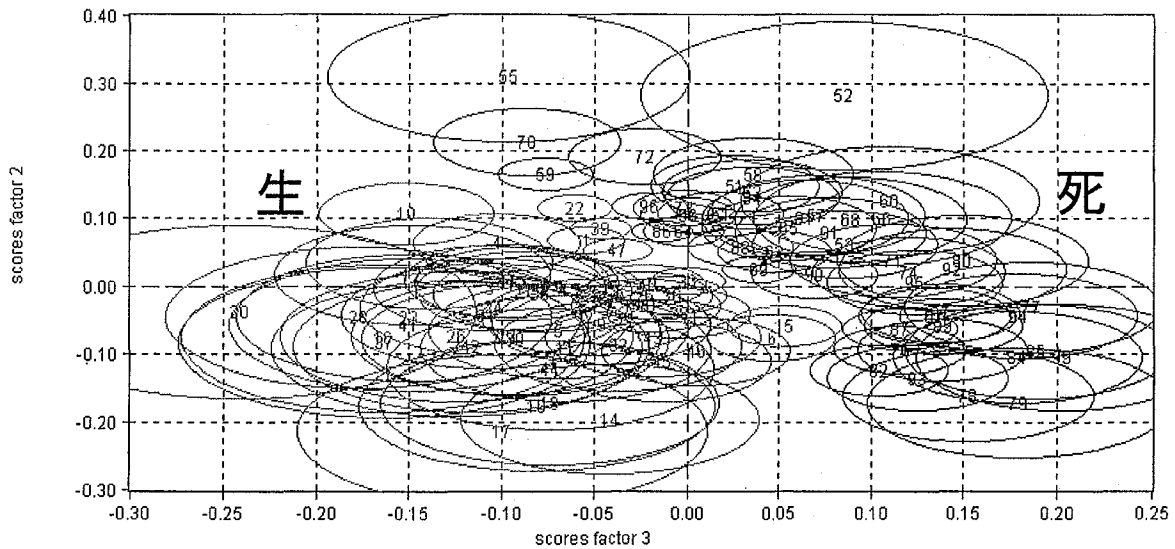


図 17 全波長域を用いたサンプル群(A+B)における判別結果

3.5.2 狭波長域、第1及び第2主成分選択

発芽率 99.5%の発芽した大豆 (50 個) と発芽率 0%の発芽しなかった大豆 (50 個) を合わせて1つのサンプル群 (C+D) を作り、1000[nm]-2500[nm]の全波長域を2-3[nm]に区切り、それぞれの波長域における第1及び第2主成分について、クラスターキャリブレーションを行った。それぞれの波長域における第1及び第2主成分のファクター、大豆の生と死におけるクラスの数とそれらの合計を示した結果、最も生死の判別ができていた波長域の第1及び第2主成分とファクター及び、生と死におけるクラスの数を表10及び表11に示した。

表 10 第1主成分：最も生死の判別ができていた波長域

波長域 [nm]	生のクラス数	死のクラス数	生+死のクラス数	ファクター
1151-1154	1	1	2	1
1274-1288	1	1	2	1
1359-1375	1	1	2	1
1975-1984	1	1	2	1
2058-2073	1	1	2	1

表 11 第 2 主成分：最も生死の判別ができていた波長域

波長域 [nm]	生のクラス数	死のクラス数	生+死のクラス数	ファクター
1142-1145	1	1	2	1
1314-1327	1	1	2	1
1389-1394	1	1	2	1
1956-1965	1	1	2	1
1965-1975	1	1	2	1
2043-2053	1	1	2	1

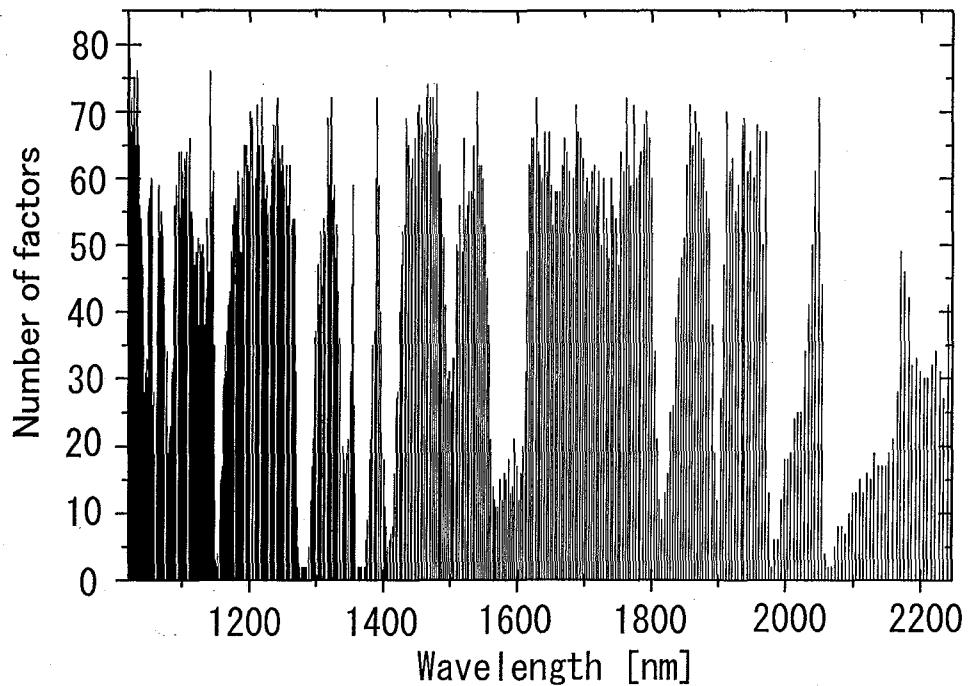


図 18 第 1 主成分を用いた時の生と死の合計クラス数

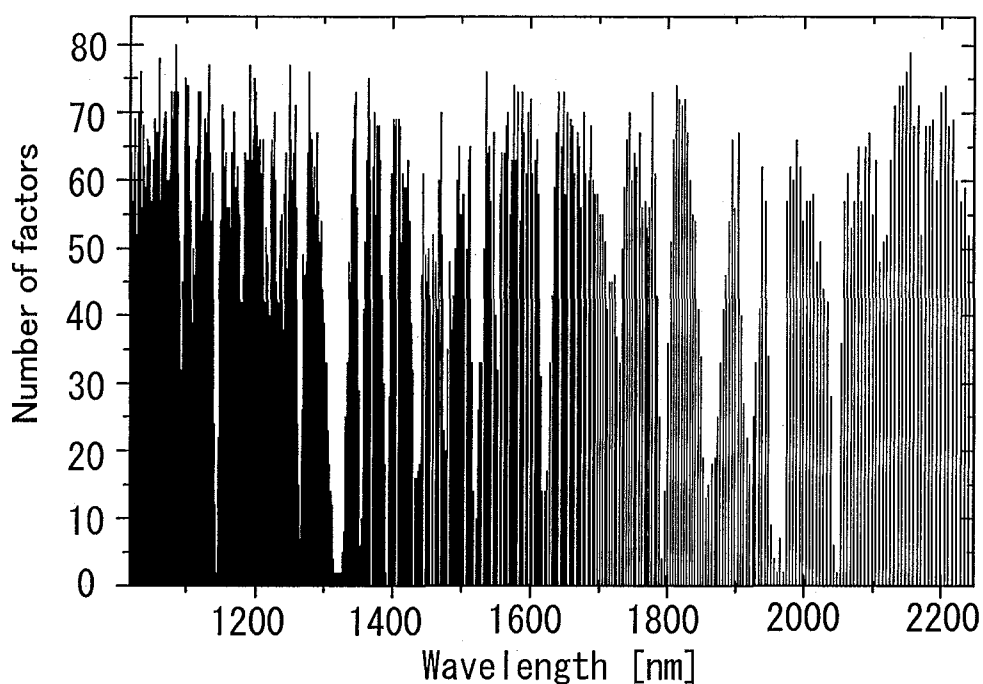


図 19 第 2 主成分を用いた時の生と死の合計クラス数

第 1 主成分を選択した場合、1151-1154[nm]、1274-1288[nm]、1359-1375[nm]、1975-1984[nm]、2058-2073[nm]の 5 つの波長域を用いた場合が、生と死のクラス (集団) がそれぞれ 1 個、合計クラス数が 2 となり、明確に判別できていることがわかる。同じように、第 2 主成分を選択した場合、1142-1145[nm]、1314-1327[nm]、1389-1394[nm]、1956-1965[nm]、1965-1975[nm]、2043-2053[nm]の 6 つの波長域を用いた場合、生と死のクラス (集団) がそれぞれ 1 個となり、明確に判別できていることがわかる。生と死の判別に重要な波長域は、第 2 主成分よりも、第 1 主成分を選択すれば充分であることがわかった。以上のことより、第 1 主成分を用いて判別図を作成し、5 つの波長域に帰属する大豆の成分について検討した。

1151-1154[nm]、1274-1288[nm]、1359-1375[nm]、1975-1984[nm]、2058-2073[nm]の波長域を用いて、第 1 主成分をそれぞれ横軸及び縦軸にプロットした (図 20-24)。全波長域を用いた判別図よりも、サンプル群 (C+D) において、発芽した大豆 (生) としなかった大豆 (死) が、明確に判別されることが示された。

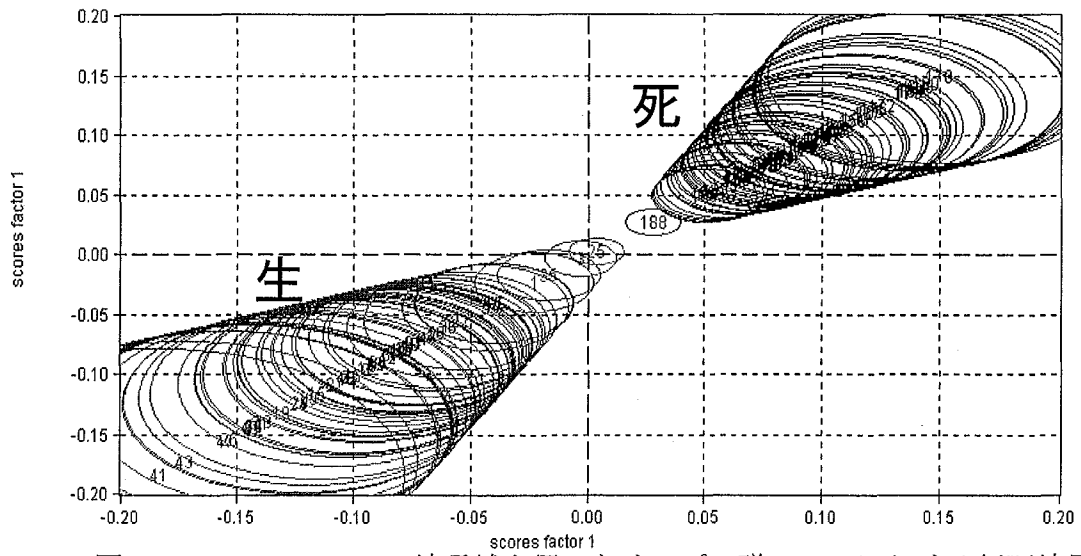


図 20 1151-1154[nm]の波長域を用いたサンプル群(C+D)における判別結果

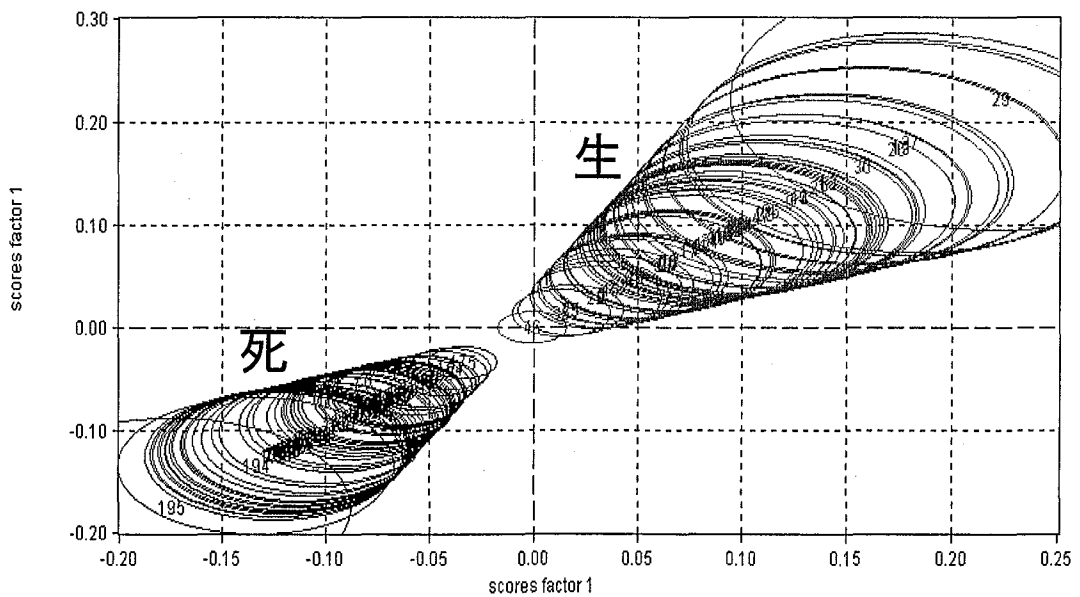


図 21 1274-1288 [nm]の波長域を用いたサンプル群(C+D)における判別結果

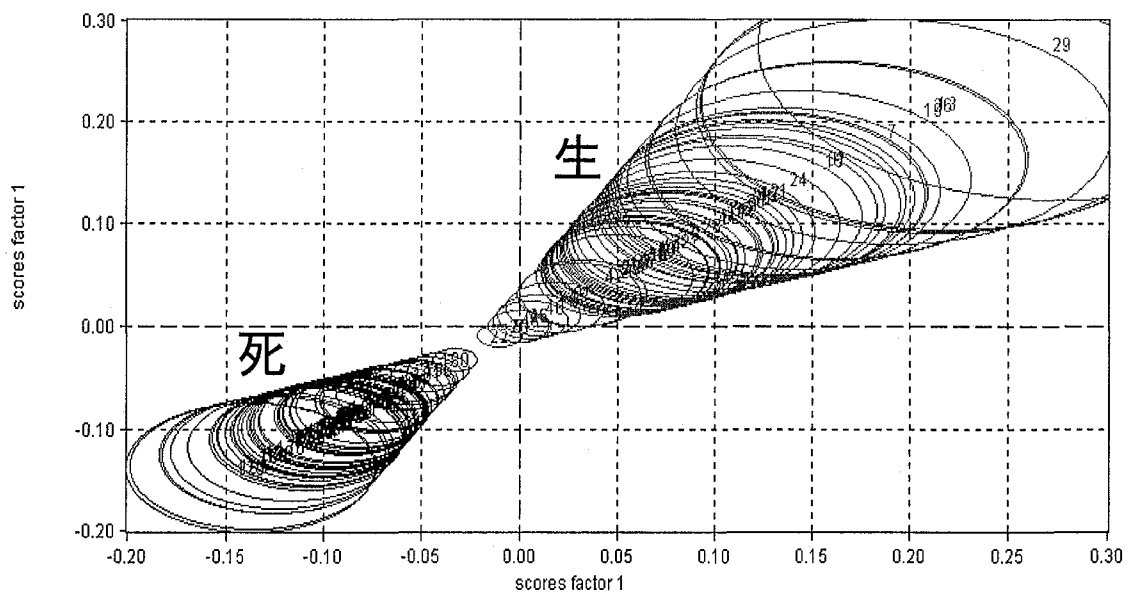


図 22 1359-1375 [nm]の波長域を用いたサンプル群(C+D)における判別結果

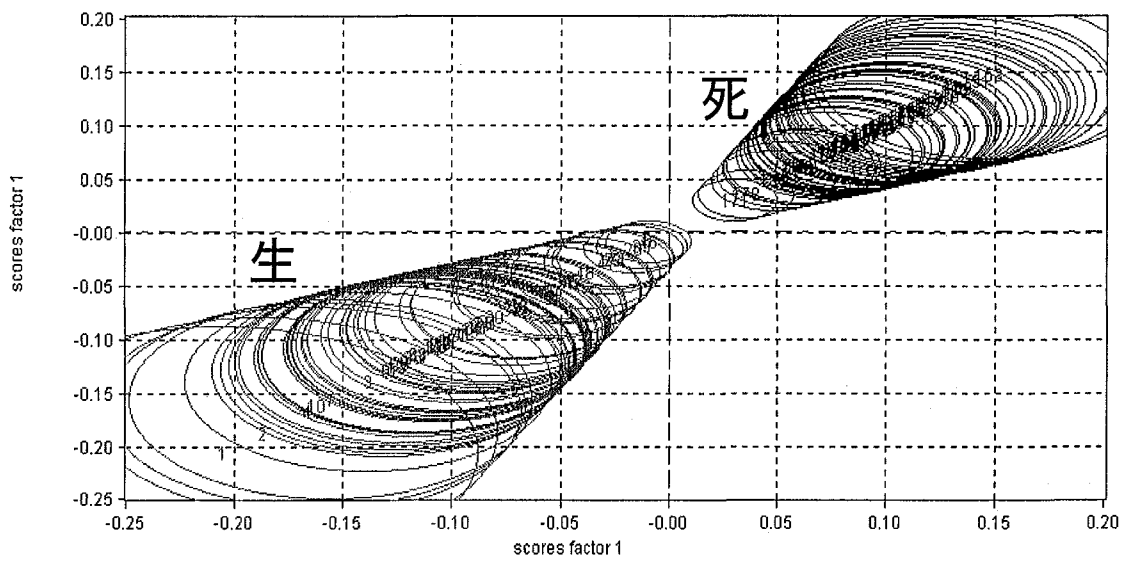


図 23 1975-1984 [nm]の波長域を用いたサンプル群(C+D)における判別結果

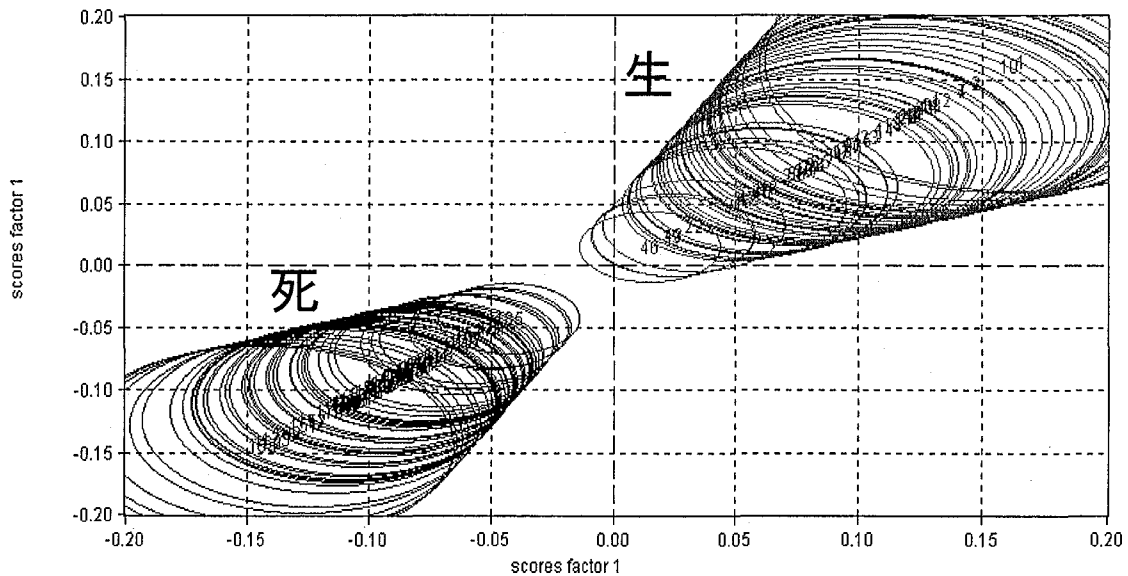


図 24 2058-2073 [nm]の波長域を用いたサンプル群(C+D)における判別結果

3.6 バリデーション

3.5 で判明した大豆の生と死に重要な波長域 (1151-1154 [nm]、1274-1288 [nm]、1359-1375 [nm]、1975-1984 [nm]、2058-2073 [nm])を用いてサンプル群 C 及び D のクラスターキャリブレーションを作成した結果を用いて、生大豆の割合、死大豆の割合及び判別できなかった大豆の割合を、サンプル群 E、F 及び G についてバリデーションを試みた(表 12-16)。

1151-1154 [nm]を用いたキャリブレーションを使って評価したバリデーションにおいて、サンプル群 C の生大豆の正解率は 100%と高く、サンプル群 D の死大豆の正解率は 96%と 2 粒の判別不明となった。1274-1288 [nm]を用いたキャリブレーションを使って評価したバリデーションにおいて、サンプル群 C の生大豆及び D の死大豆の正解率は 98%であり、それぞれ 1 粒が判別不明であった。1359-1375 [nm]を用いたキャリブレーションを使って評価したバリデーションにおいて、サンプル群 C の生き大豆及び D の死大豆の正解率は 96%であり、それぞれ 2 粒が判別不明であった。1975-1984 [nm]を用いたキャリブレーションを使って評価したバリデーションにおいて、サンプル群 C の生大豆の正解率は 96%、サンプル群 D の死大豆の正解率は 98%となり、それぞれ 2 粒及び 1 粒の判別不明となった。次に、2058-2073 [nm]を用いて行ったバリデーションにおいては、サンプル群 C の生き大豆の正解率は 96%と 2 粒の判別不明があるが、サンプル群 D の死大豆の正解率は 100%と判別された。サンプル群 C 及び D の発芽率は 99.5%及び 0%なので、サンプル群 C の生き大豆で判別不能に属された大豆は死大豆の

可能性があり、サンプル群 D における死大豆で判別不能に属された大豆は生き大豆の可能性もある。

また、それぞれの5つの波長域のキャリブレーション式を用いてサンプル群 E、F 及び G のバイリデーションを行った結果、生き大豆及び死大豆の正解率が 0% であり、全ての大豆が判別不明と判断された。発芽率 48%、65% 及び 87% であるサンプル群 E、F 及び G の生大豆は発芽率 99.5% の生大豆のクラスには属せず、他のクラスに判別されている。すなわち、品質の良好な発芽率が約 100% の生きた大豆はほぼ 100% の判別が可能であり、品質の劣悪な発芽率が数% の死んだ大豆の判別も可能であった。また、発芽率が約 50% から 90% のやや品質が劣化した大豆では、生きているとも死んでいるとも判別ができない結果であった。

以上の結果から、品質の良好な発芽率が約 100% の生きた大豆はほぼ 100% の判別が可能であり、その他の大豆である品質の劣悪な発芽率が数% の死んだ大豆や発芽率が約 50% から 90% のやや品質が劣化した大豆とは、明確に判別することができ、作成した判別システムは大豆の品質判定に有効であると思われる。

表 12 1151-1154 [nm]を用いたキャリブレーションを使って
評価したバイリデーションサンプル

サンプル群	生大豆の割合(正解率%)	死大豆の割合(正解率%)	判別不明
サンプル群 C	50/50 (100%)		0/50
サンプル群 D		48/50 (96%)	2/50
サンプル群 E	0/67 (0%)		67/67
		0/22 (0%)	22/22
サンプル群 F	0/58 (0%)		58/58
		0/33 (0%)	33/33
サンプル群 G	0/89 (0%)		89/89
		0/10 (0%)	10/10

表 13 1274-1288 [nm]を用いたキャリブレーションを使って
評価したバリデーションサンプル

サンプル群	生大豆の割合(正解率%)	死大豆の割合(正解率%)	判別不明
サンプル群 C	49/50 (98%)		1/50
サンプル群 D		49/50 (98%)	1/50
サンプル群 E	0/67 (0%)		67/67
		0/22 (0%)	22/22
サンプル群 F	0/58 (0%)		58/58
		0/33 (0%)	33/33
サンプル群 G	0/89 (0%)		89/89
		0/10 (0%)	10/10

表 14 1359-1375 [nm]を用いたキャリブレーションを使って
評価したバリデーションサンプル

サンプル群	生大豆の割合(正解率%)	死大豆の割合(正解率%)	判別不明
サンプル群 C	48/50 (96%)		2/50
サンプル群 D		48/50 (96%)	2/50
サンプル群 E	0/67 (0%)		67/67
		0/22 (0%)	22/22
サンプル群 F	0/58 (0%)		58/58
		0/33 (0%)	33/33
サンプル群 G	0/89 (0%)		89/89
		0/10 (0%)	10/10

表 15 1975-1984 [nm]を用いたキャリブレーションを使って
評価したバリデーションスンプル

サンプル群	生大豆の割合(正解率%)	死大豆の割合(正解率%)	判別不明
サンプル群 C	48/50 (96%)		2/50
サンプル群 D		49/50 (98%)	1/50
サンプル群 E	0/67 (0%)		67/67
		0/22 (0%)	22/22
サンプル群 F	0/58 (0%)		58/58
		0/33 (0%)	33/33
サンプル群 G	0/89 (0%)		89/89
		0/10 (0%)	10/10

表 16 2058-2073 [nm]を用いたキャリブレーションを使って
評価したバリデーションスンプル

サンプル群	生大豆の割合(正解率%)	死大豆の割合(正解率%)	判別不明
サンプル群 C	47/50 (94%)		3/50
サンプル群 D		50/50 (100%)	0/50
サンプル群 E	0/67 (0%)		67/67
		0/22 (0%)	22/22
サンプル群 F	0/58 (0%)		58/58
		0/33 (0%)	33/33
サンプル群 G	0/89 (0%)		89/89
		0/10 (0%)	10/10

3.7 2次微分スペクトル上の差異

図 20-24 の 2 次元判別図上において、発芽した大豆 (生) としなかった大豆 (死) が最も離れているそれぞれのスペクトル (表 17) について、2 次微分スペクトル上の差異について調べた(図 26-34)。

図 27、29、31、33 及び 34 の 1151-1154[nm]、1274-1288[nm]、1359-1375 [nm]、1975-1984 [nm]及び 2058-2073 [nm]付近を拡大した 2 次微分スペクトルに差異が見られ、この差異が判別に役立っているものと思われる。

表 17 生と死が最も離れているスペクトル番号

生と死の判別に重要な波長域[nm]	生のスペクトル番号	死のスペクトル番号
1151-1154[nm]	41	78
1274-1288[nm]	29	95
1359-1375 [nm]	29	79
1975-1984 [nm]	1	53
2058-2073 [nm]	1	53

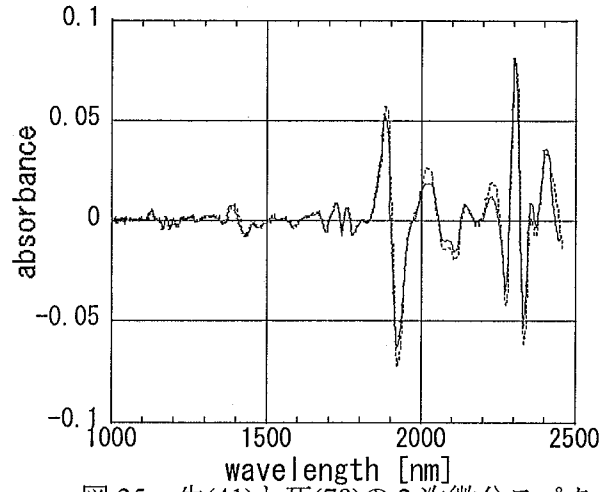


図 25 生(41)と死(78)の 2 次微分スペクトル

— 2次微分-41	2 次微分-41 : 生(41)の 2 次微分スペクトル
..... 2次微分-78	2 次微分-78 : 死(78)の 2 次微分スペクトル

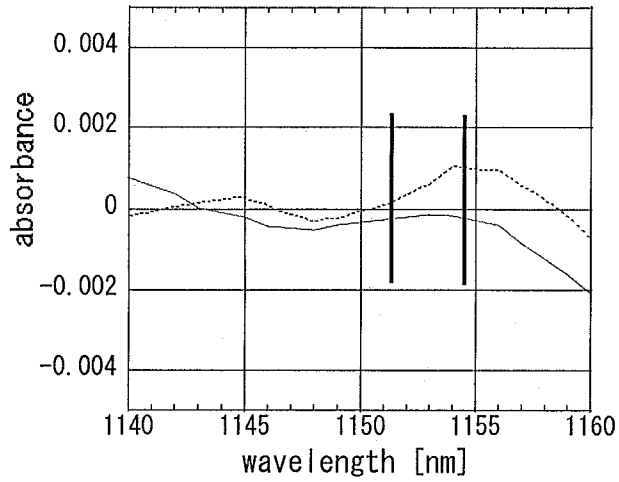


図 26 1151-1154[nm]付近を拡大した生(41)と死(78)の 2 次微分スペクトル

— 2次微分-41	2 次微分-41 : 生(41)の 2 次微分スペクトル
..... 2次微分-78	2 次微分-78 : 死(78)の 2 次微分スペクトル

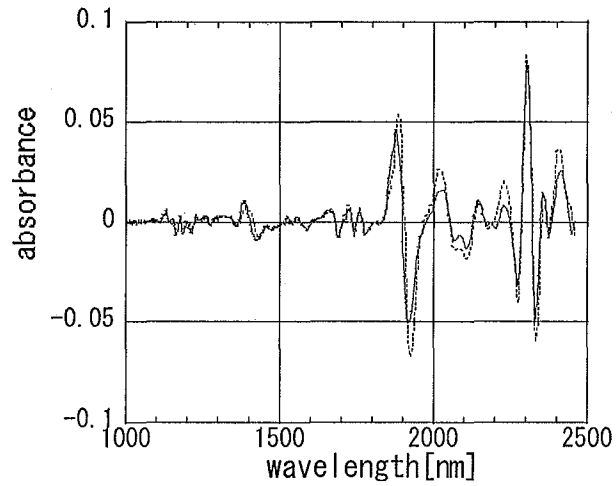


図 27 生(29)と死(95)の2次微分スペクトル

— 2次微分-29 2次微分-29：生(29)の2次微分スペクトル
..... 2次微分-95 2次微分-95：死(95)の2次微分スペクトル

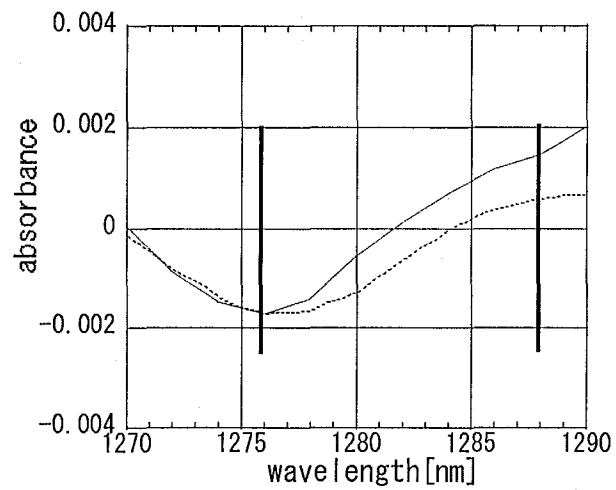


図 28 1274-1288 [nm]付近を拡大した生(29)と死(95)の2次微分スペクトル

— 2次微分-29 2次微分-29：生(29)の2次微分スペクトル
..... 2次微分-95 2次微分-95：死(95)の2次微分スペクトル

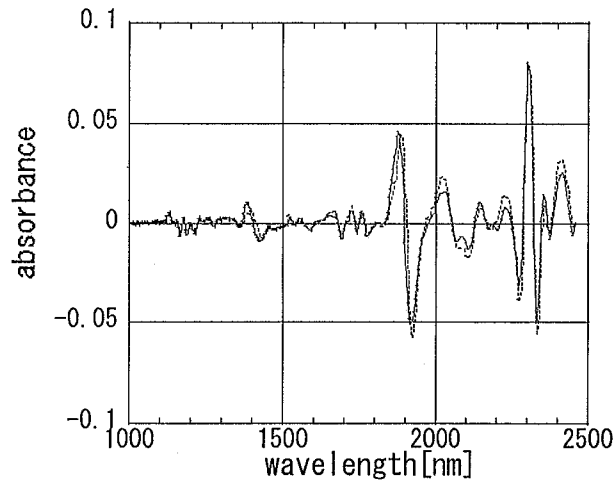
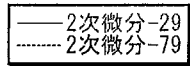


図 29 生(29)と死(79)の 2 次微分スペクトル



2 次微分-29 : 生(29)の 2 次微分スペクトル

2 次微分-79 : 死(79)の 2 次微分スペクトル

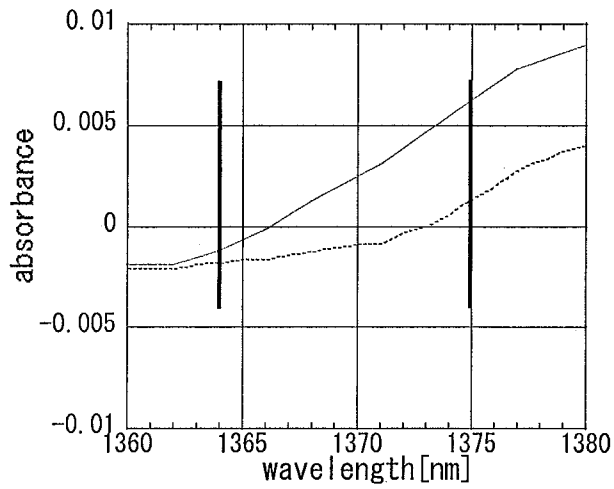
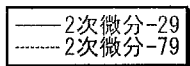


図 30 1359-1375 [nm]付近を拡大した生(29)と死(79)の 2 次微分スペクトル



2 次微分-29 : 生(29)の 2 次微分スペクトル

2 次微分-79 : 死(79)の 2 次微分スペクトル

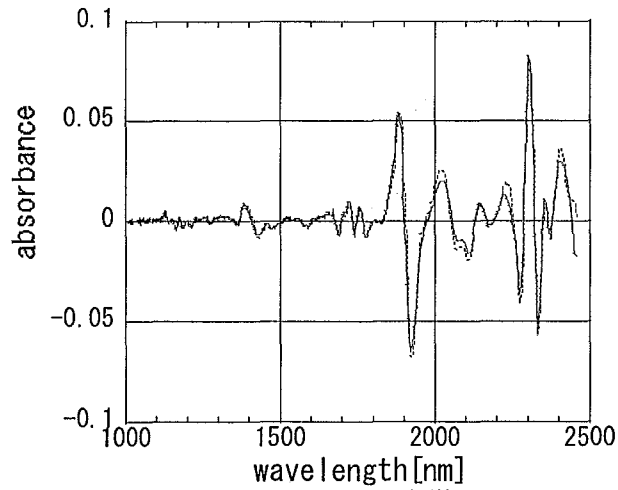


図 31 生(1)と死(53)の 2 次微分スペクトル

— 2次微分-1
 2次微分-53

2 次微分-1 : 生(1)の 2 次微分スペクトル

2 次微分-53 : 死(53)の 2 次微分スペクトル

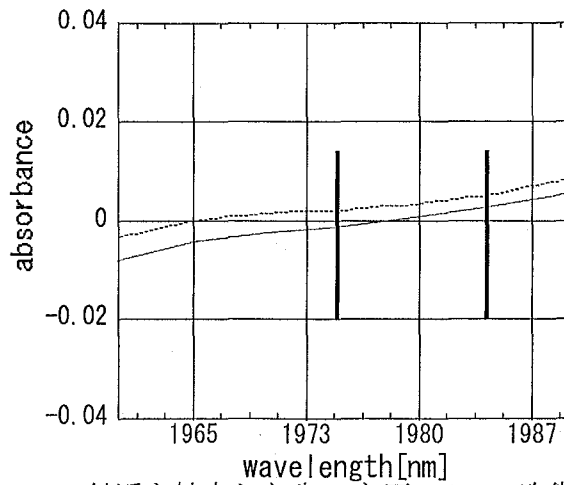


図 32 1975-1984 [nm] 付近を拡大した生(1)と死(53)の 2 次微分スペクトル

— 2次微分-1
 2次微分-53

2 次微分-1 : 生(1)の 2 次微分スペクトル

2 次微分-53 : 死(53)の 2 次微分スペクトル

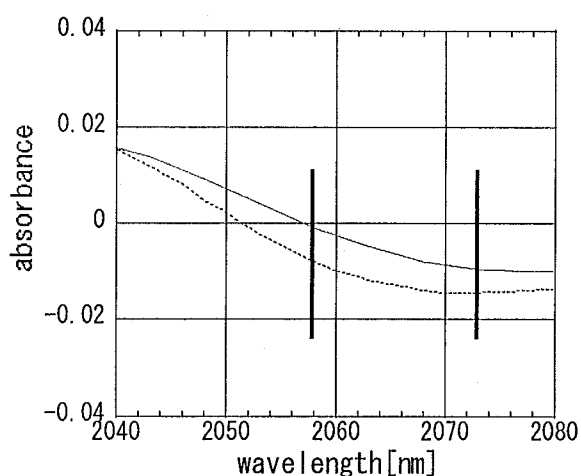


図 33 2058-2073 [nm] 付近を拡大した生(1)と死(53)の2次微分スペクトル

— 2次微分-1
 2次微分-53

2次微分-1：生(1)の2次微分スペクトル

2次微分-53：死(53)の2次微分スペクトル

3.8 判別に有効であった波長域の帰属

近赤外領域におけるタンパク質に由来する波長域を、既知の帰属表を参考にして選定した(表 18)。タンパク質の帰属波長域を比較すると、1151-1154 [nm]と 1152 [nm]、1359-1375 [nm]と 1360 [nm]、1975-1984 [nm]と 1980 [nm]が一致しているが、タンパク質に帰属すると思われる波長域は 1980 [nm]の N-H asym.str.+amide II である。

表 18 タンパク質の帰属波長⁴⁾

波長 [nm]	Bond vibration	Structure
1000	O-H str. second overtone	ArOH
1015	2×C-H str.+3×C-H def.	CH ₃
1020	2×N-H str.+2×amide I	protein
1030	N-H str. second overtone	RNH ₂
1053	2×C-H str.+2×C-H def.+(CH ₂)n	CH ₂
1060	N-H str. second overtone	RNH ₂
1080	2×C-H str.+2×C-C str.	benzene
1143	C-H str. second overtone	aromatic
1152	C-H str. second overtone	CH ₃
1195	C-H str. second overtone	CH ₃

1215	C-H str. second overtone	CH ₂
1225	C-H str. second overtone	CH
1360	2×C-H str.+C-H def..	CH ₃
1395	2×C-H str.+C-H def..	CH ₂
1410	O-H str. first overtone	ROH
1415	2×C-H str.+C-H def..	CH ₂
1417	2×C-H str.+C-H def..	aromatic
1420	O-H str. first overtone	ArOH
1430	N-H str. first overtone	CONH ₂
1440	2×C-H str.+C-H def..	CH
1446	2×C-H str.+C-H def..	aromatic
1460	N-H str. first overtone	CONH ₂
1483	N-H str. first overtone	CONH ₂
1490	N-H str. first overtone	CONH ₂
1500	N-H str. first overtone	NH
1510	N-H str. first overtone	protein
1520	O-H str. first overtone	CONH ₂
1520	N-H str. first overtone	ROH
1530	N-H str. first overtone	RNH ₂
1685	C-H str. first overtone	aromatic
1695	C-H str. first overtone	CH ₃
1705	C-H str. first overtone	CH ₃
1725	C-H str. first overtone	CH ₂
1740	S-H str. first overtone	-SH
1765	C-H str. first overtone	CH ₂
1900	C=O str. second overtone	-CO ₂ R
1950	C=O str. second overtone	-CO ₂ R
1960	N-H asym.str.+amide II	CONH ₂
<u>1980</u>	<u>N-H asym.str.+amide II</u>	<u>protein</u>
2000	N-H sym.str.+amide II	CONH ₂
2030	C=O str. second overtone	CONH ₂
2050	N-H sym.str.+amide II	protein
2080	O-H str.+O-H def.	ROH
2110	N-H sym.str.+amide III	CONH ₂
2132	N-H str.+C=O str.	amino acid
2150	2×amide I +amide III	CONH ₂

2180	2×amide I +amideIII	protein
2242	CH ₂ asym. str.+C= str.	HC=CH
2280	C-H str.+C-H def.	CH ₃
2294	N-H str.+C=O str.	amino acid
2310	C-H str.+C-H def.	CH ₂
2323	C-H str.+C-H def.	CH ₂
2380	O-H def. second overtone	ROH

3.9 判別に有効であった波長域と大豆中のタンパク質の変化

赤外線水分計を用いてサンプル群 H-L の含水率を測定した。2つの天秤に乗せたそれぞれの大豆の重量の平均値及び、2回の測定の平均値を示した(表 19)。サンプル群 H を経時的に劣化させたサンプル群 H-L は、発芽率が低くなるに連れて、含水率値も小さくなっている。

表 19 サンプル群 H-L の含水率

サンプル群	発芽率[%]	大豆の重量[g]	含水率測定値[%]
サンプル群 H	97%	3.37g	15.7 %
サンプル群 I	50%	3.49g	12.9%
サンプル群 J	30%	3.34g	10.7%
サンプル群 K	10%	3.35g	10.8%
サンプル群 L	0%	3.4g	8.6%

0.2、0.4、0.6、0.8 mg/ml の標準溶液 20ml ずつマイクロチューブにとり、1ml の CBB 試薬を加えたそれぞれのサンプルの 595.0[nm]における吸光度と検量線用データを表 20 に示した。サンプル群 H-L の水抽出液を 20ml ずつマイクロチューブにとり、1ml の CBB 試薬を加えたそれぞれのサンプルにおいて、595.0 [nm]における吸光度の 3 回の測定結果及び、作製した検量線から各試料中のタンパク質濃度が決定された。3 回のタンパク質の濃度測定結果とその平均値を示した(表 21)。ここで求められたタンパク質の濃度の平均値は、SDS-PAGE に添加するタンパク質の濃度が異なるサンプルのタンパク質の濃度を一定にするために、使用する添加量を変えるのに用いた。

表 20 標準溶液の吸光度

標準溶液 [mg/ml]	吸光度
0.2	0.152
0.4	0.262
0.6	0.325
0.8	0.511

検量線：タンパク質の濃度=1.560×吸光度

表 21 サンプル群 H-L の吸光度とタンパク質の濃度

サンプル群	吸光度			タンパク質の濃度			
	1 回目	2 回目	3 回目	1 回目	2 回目	3 回目	平均値
サンプル群 H	0.227	0.212	0.221	0.354	0.331	0.345	0.343
サンプル群 I	0.374	0.384	0.379	0.584	0.6	0.591	0.592
サンプル群 J	0.287	0.313	0.291	0.448	0.489	0.454	0.464
サンプル群 K	0.484	0.493	0.494	0.756	0.769	0.771	0.765
サンプル群 L	0.506	0.515	0.507	0.79	0.804	0.791	0.795

計測したタンパク質濃度を基にして、大豆サンプル群 H-L のそれぞれの大豆タンパク質量が $6\mu\text{g}$ になるように、ウェルに注入するサンプルの量を決定し、SDS-PAGE で解析を行った (図 34)。サンプルは左から、マーカー ($3\mu\text{l}$)、発芽率の異なるサンプル群 H-L ($6\mu\text{g}$) を泳動させた。マーカーの組成を表 22 に示す。

発芽率 97% のサンプル群 H から発芽率 0% のサンプル群 L と変化するにつれて、31.0 [kDa] 及び 21.5 [kDa] 付近の 2 つのバンドに大きな変化が見られた。31.0 [kDa] のバンドは発芽率が 0% のサンプル群 G において、消失しており、21.5 [kDa] のバンド幅は、増加している。31.0 [kDa] 及び 21.5 [kDa] の 2 つのバンド面積を数値化するために、解析用ソフトウェア (Scion Image) を用いてバンドのピーク面積の割合を測定した (表 23)。

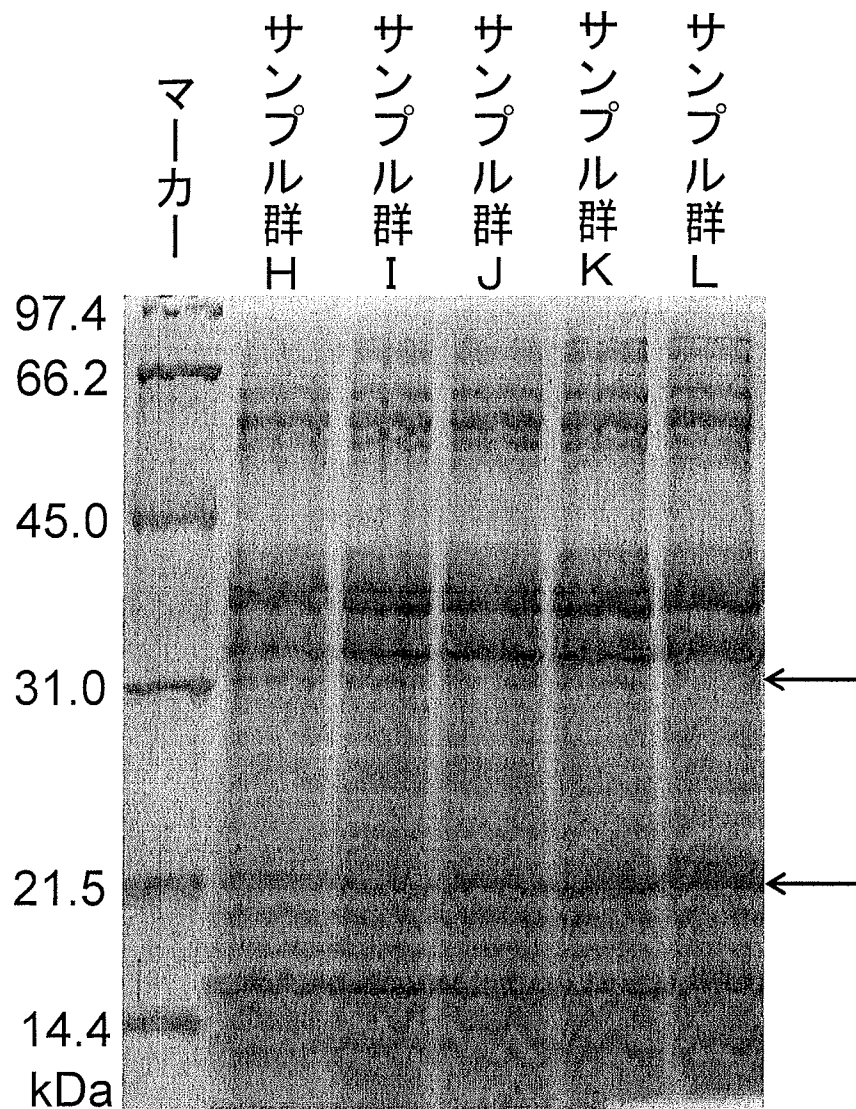


図 34 大豆水抽出物の SDS-PAGE

表 22 マーカーの組成

分子量 [kDa]	由来	タンパク質名
97.4	ウサギの筋肉	Phosphorylase B
66.2	ウシ亜科	Serum albumin
45.0	ニワトリ卵白	Ovalbumin
31.0	ウシ亜科	Carbonicanhydrase
21.5	大豆	Trypsin inhibitor
14.4	ニワトリ卵白	Lysozyme

表 23 各サンプル群の分子量 31.0 [kDa]及び 21.5 [kDa]のピーク面積の割合

サンプル群	バンド面積 [%]	
	分子量 31.0 [kDa]	分子量 21.5 [kDa]
サンプル群 H	3.00%	5.49%
サンプル群 I	3.12%	6.80%
サンプル群 J	2.63%	7.46%
サンプル群 K	2.57%	8.00%
サンプル群 L	0.00%	9.37%

分子量 31.0 [kDa]において、バンドのピーク面積の割合は、発芽率 97%のサンプル群 H (3%)及び発芽率 50%のサンプル群 I (3.12%)を比較すると、0.12%の増加が見られるものの、発芽率 0%のサンプル群 L では 0%と消失している事がわかった。また、分子量 21.5 [kDa]において、発芽率 97%のサンプル群 H から発芽率 0%のサンプル群 L と変化するにつれてバンドのピーク面積の割合が 5.49%-9.37%に増えている事がわかった。分子量 31.0 [kDa]及び 21.5 [kDa]の 2 つのバンドは、マーカーにおけるウシ亜科由来の Carbonicanhydrase 及び、大豆由来の Trypsin inhibitor である。Ranjana Nrayan, G.S.Chauhan & N.S. Verma 等⁶⁾によると、大豆の保存期間中 (1、2、3 及び 9 年間)の大豆の Trypsin inhibitor とリポキシゲナーゼ活性は減少するとされており、トリプシン阻害は自然状態ではタンパク質性であり、保存中のいろいろな温度や湿度にさらされて変性するのかもしれない。また、リポキシゲナーゼ活性の減少は、リポキシゲナーゼ酵素の劣化であり、保存期間中の基質濃度などや、リノール酸の減少も同じであると述べている。大豆の生と死の判別に重要な波長域と Trypsin inhibitor の含有量の変化との関係は、さらなる研究が必要である。

Carbonicanhydrase は炭酸脱水酵素であるが、試料中の分子量 31.0 [kDa]付近のバンドは Carbonicanhydrase である可能性は低く、さらにウエスタンブロッティング等の研究が必要である。

3.10 判別に有効であった波長域と大豆中の糖質の変化

近赤外分光法を用いて測定した反射原スペクトルを図 35 に、二次微分スペクトルを図 36 に示す。また、標品の粉末と水溶液の近赤外原スペクトルを図 37~40 に示す。水溶液は、ほとんど水のスペクトルが強調された結果となり、大豆の近赤外スペクトルとの比較には、標品の粉末の近赤外スペクトルを用いた。図 35 中の矢印は、それぞれの糖質に特徴のあるピークである。⁴⁾

図 40 の水の近赤外原スペクトルから分かるように、1850 nm 以降の波長域において、センサが飽和している。また、各標品のほとんどの水溶液において同様に、1850 nm 以降のセンサが飽和した。

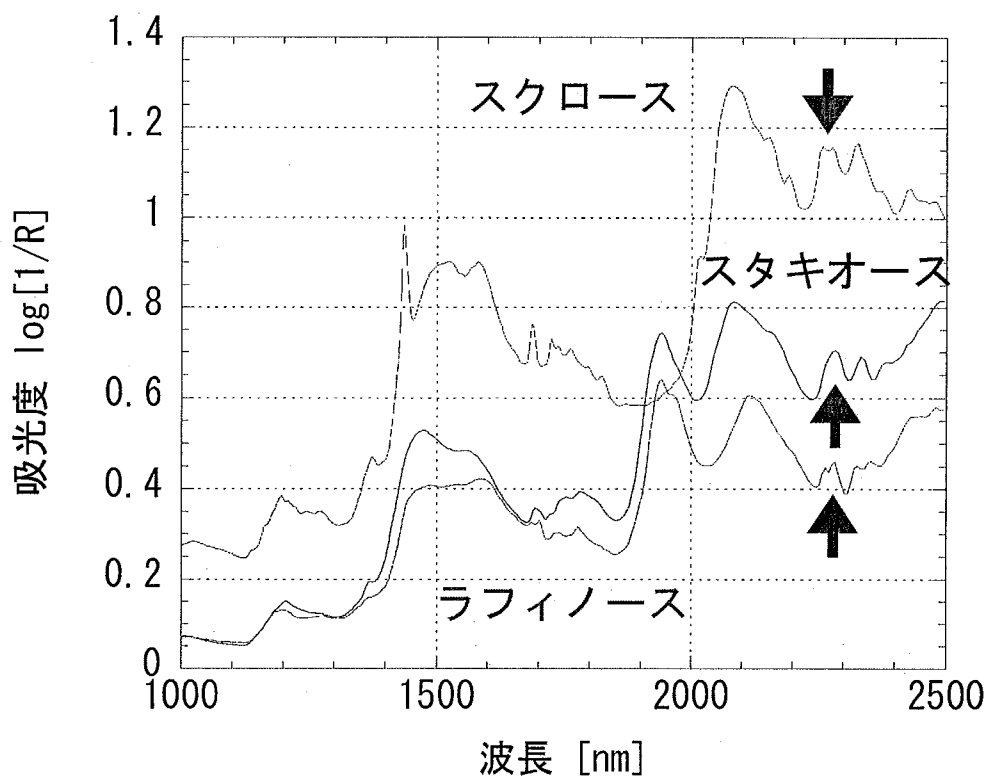


図 35 標品の近赤外原スペクトル

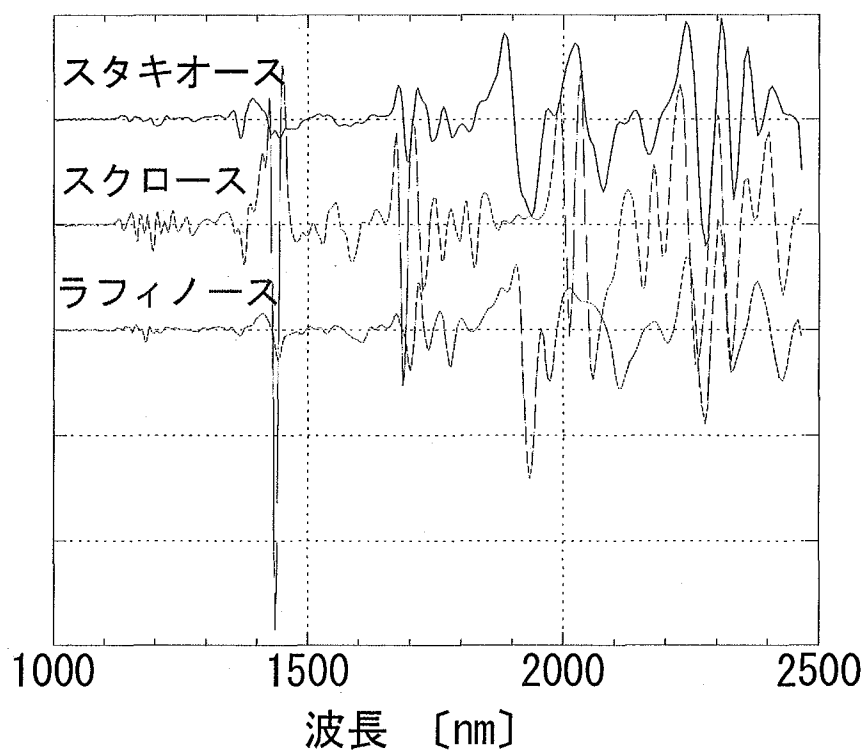


図 36 標品の近赤外二次微分スペクトル

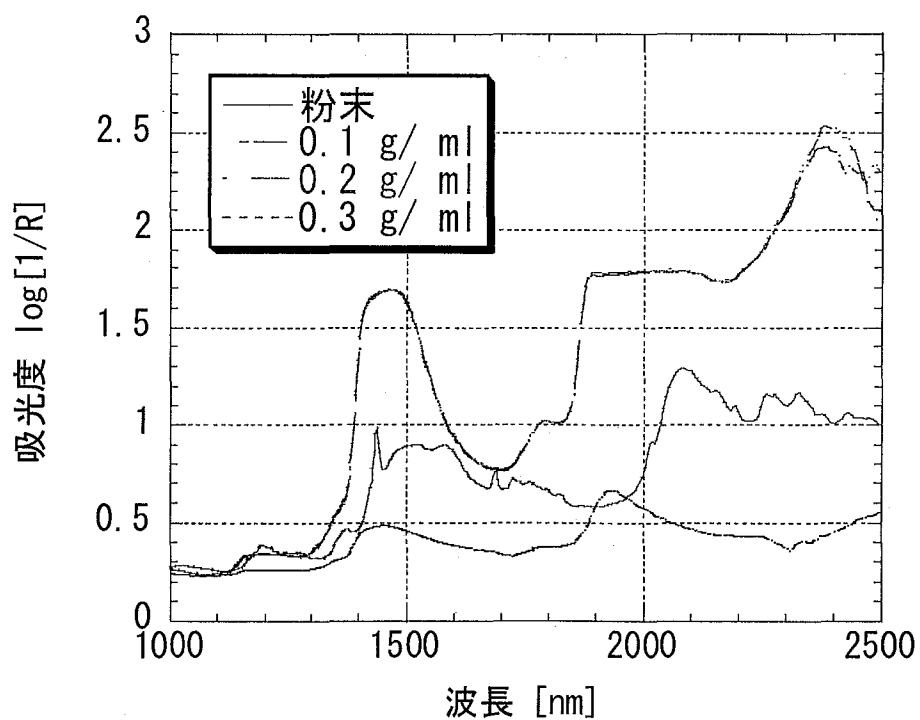


図 37 スクロース標品の粉末と水溶液の
近赤外原スペクトル

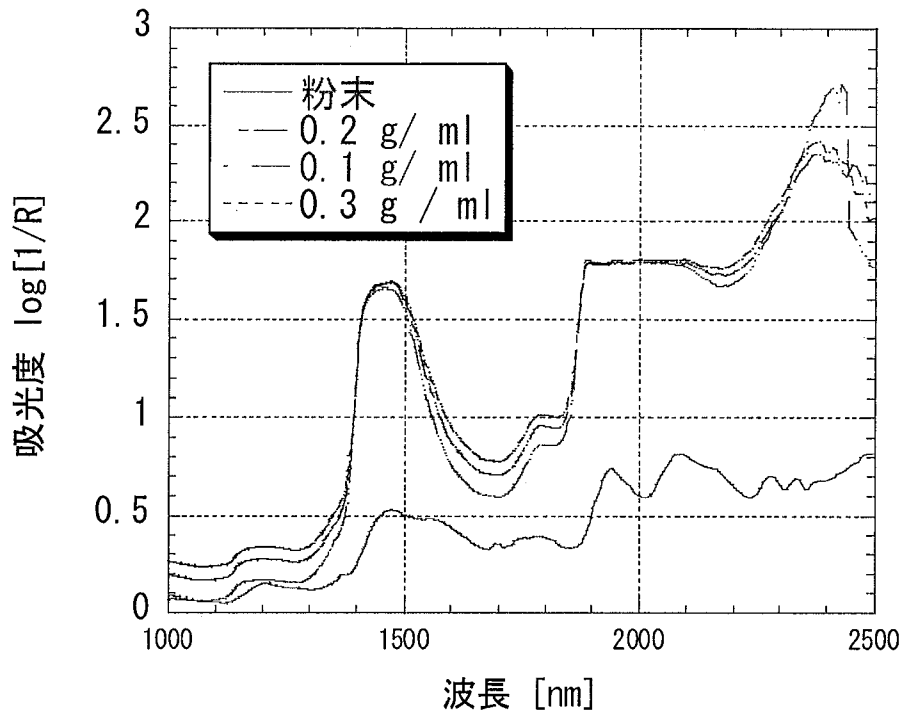


図 38 スタキオース標品の粉末と水溶液の
近赤外原スペクトル

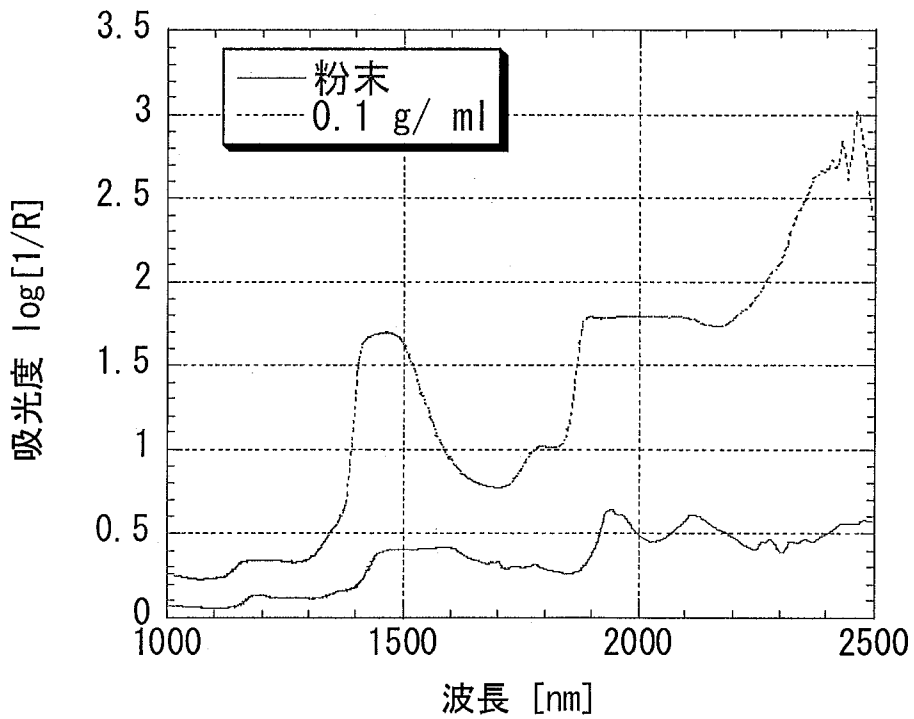


図 39 ラフィノース標品の粉末と水溶液の近赤外原スペクトル

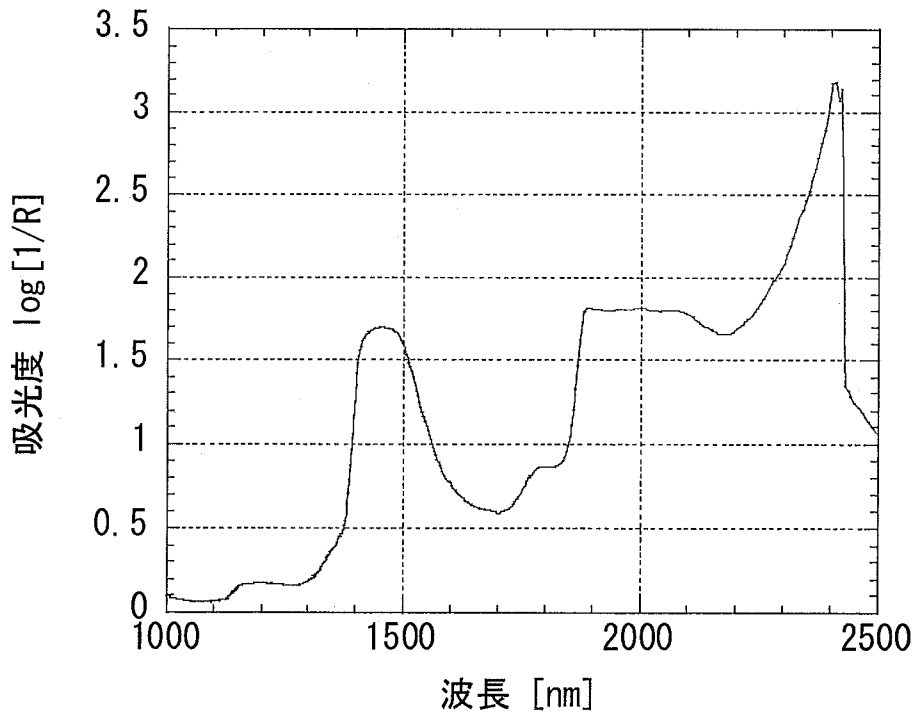


図 40 水の近赤外原スペクトル

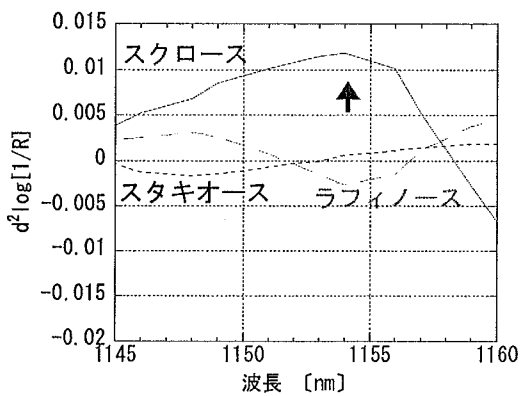


図 41 標品の二次微分スペクトル
(1151-1154 nm)

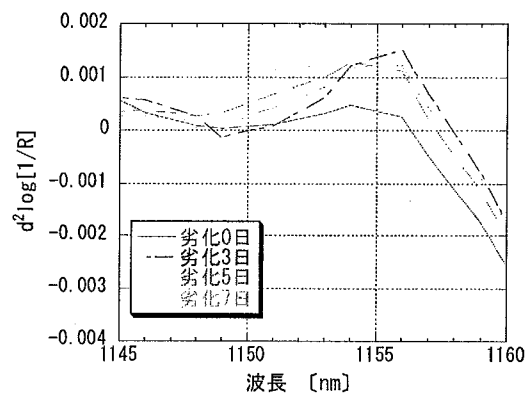


図 42 大豆の二次微分スペクトル
(1151-1154 nm)

判別に重要な波長域の内、1150-1155 nm にスクロースの吸収がみられた(図 41)。劣化 3～5 日の二次微分値に大きな差異は無いが、劣化 0 日の二次微分値からスクロース含有量の増加を示すように変化していた。

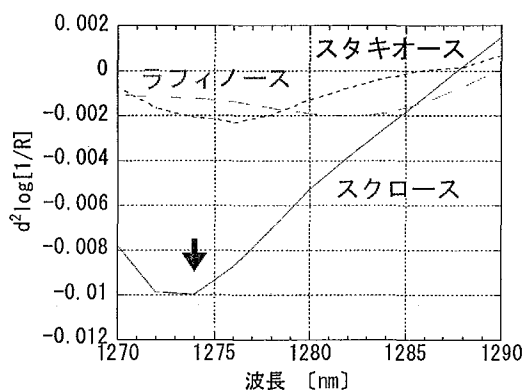


図 43 標品の二次微分スペクトル
(1274-1288 nm)

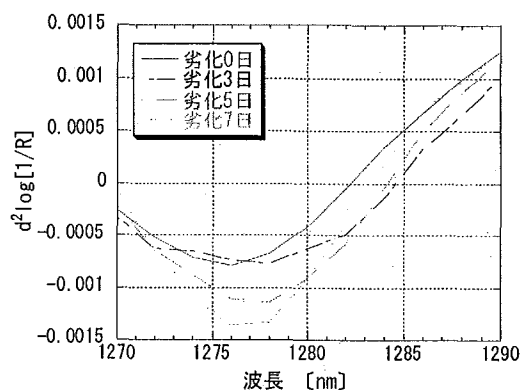


図 44 大豆の二次微分スペクトル
(1274-1288 nm)

波長域 1274-1288 nm には 1274-1276 nm にスクロースの吸収がみられた(図 43)。劣化が進むにつれてスクロース含有量の増加を示すように二次微分値が変化していた(図 44)。

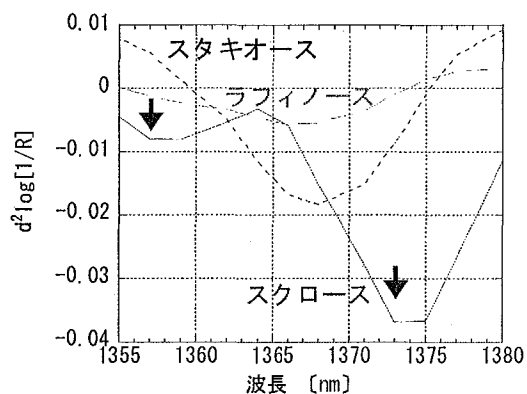


図 45 標品の二次微分スペクトル
(1359-1375 nm)

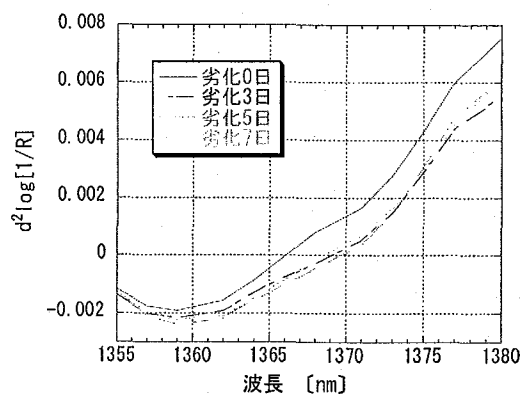


図 46 大豆の二次微分スペクトル
(1359-1375 nm)

波長域 1359-1375 nm には 1359 と 1373 nm にスクロースの吸収がみられた(図 45)。劣化が進むにつれてスクロース含有量の増加を示すように二次微分値が変化していた(図 46)。

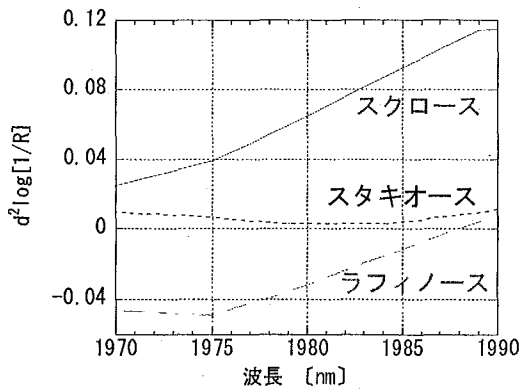


図 47 標品の二次微分スペクトル
(1975-1984 nm)

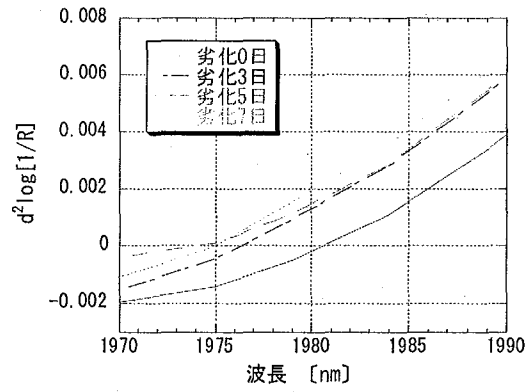


図 48 大豆の二次微分スペクトル
(1975-1984 nm)

波長域 1975-1984 nm には、いずれの標品の吸収もみられず、劣化 0 日の二次微分値が最も高く、劣化が進むにしたがい吸光度が減少していたことがわかる。(図 48)。

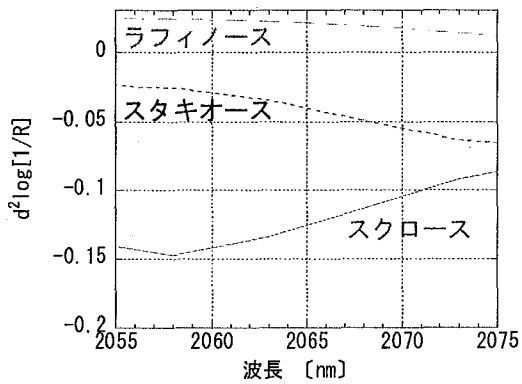


図 49 標品の二次微分スペクトル
(2058-2073 nm)

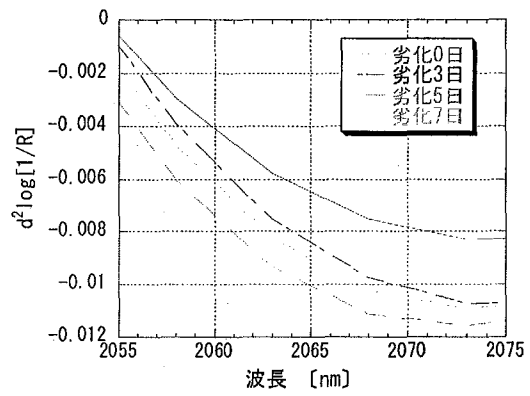


図 50 大豆の二次微分スペクトル
(2058-2073 nm)

波長域 2058-2073 nm には、いずれの標品の吸収もみられず、劣化 5 日の二次微分値が最も高く、劣化が進むにしたがい吸光度が増加していた。(図 50)。

スクロース含有量の測定結果を表 24 に示した。

表 24 スクロース含有量の測定結果

測定回数 〔回〕	測定時の 室温〔℃〕	大豆試料群〔g/l〕			
		劣化 0 日	劣化 3 日	劣化 5 日	劣化 7 日
1	21	0.6416	0.5645	0.6022	0.5875
2	22	0.5973	0.5875	0.6925	0.6564
3	21	0.6433	0.5744	0.6498	0.6712
4	21	0.6662	0.5826	0.6383	0.6843
5	20	0.5973	0.6121	0.5776	0.6613
平均	—	0.6292	0.5842	0.6321	0.6521

スクロース含有量の測定は、測定回によってばらつきがあらわれた。測定は 5 回実施し、その平均値を各試料群のスクロース含有量とした。また、算出したスクロース含有量は大豆の乾燥重量基準である(表 25)。劣化によるスクロース含有量の顕著な違いが無かったことから、大豆中のスクロース濃度の変化が、大豆の生死判別に貢献しているかどうかは、未だ不明である。

表 25 乾燥大豆 1.00 g あたりのスクロース含有量

スクロース含有量〔g〕			
劣化 0 日	劣化 3 日	劣化 5 日	劣化 7 日
0.06183	0.05564	0.05948	0.06129

4. 結論

近赤外分光法とクラスター分析による大豆の生死判別が可能となり、発芽率が 100% の発芽した大豆(生)と発芽率 0% の発芽しなかった(死)大豆に重要な波長域を特定する事ができた。

また、大豆タンパク質の分子量 31.0 [kDa]及び 21.5 [kDa]付近のタンパク質含有量が、大豆を経時的に劣化させることによって変化した。これらの変化が判別に重要であるか否かは不明である。

さらに、大豆中のスクロース濃度の変化が、判別に重要であるかもしれないことが示

唆されたが、現時点では明確ではない。

今後は、より実用的な大豆の生死判別システムの構築を目指し、生と死に重要な波長域と大豆成分との関連性について更なる研究が必要である。

5. 謝辞

本研究を遂行するに際しご協力をいただいた広島市立大学情報科学部情報機械システム工学科の中野靖久助教授、末原憲一郎助手、香田次郎助手、藤田八弓君、田中智君に感謝します。

6. 参考文献

- 1) <http://www.maff.go.jp/soshiki/nousan/hatashin/daizu/>
- 2) International Seed Testing Association; International rules for seed testing annexes 1976, *Seed Sci. & Technol.*, 4, 51-177 (1976).
- 3) K. Nakamichi, K. Suehara, Y. Nakano, K. Kakugawa, M. Tamai and T. Yano; Measurement of the concentration of mannosyl erythritol lipid and soubean oil in the glycolipid fermentation process using near infrared spectroscopy. *J. Near Infrared Spectrosc.*, 10, 53-61 (2002).
- 4) B. G. Osborne, T. Fearn and P. H. Hindle; PRACTICAL NIR SPECTROSCOPY, Longman Scientific & Technical, p29~p33 (1968).
- 5) H. K. Yamashita, M. Tatara, H. Takamura and T. Matoba; Effect of secondary structures of protein on determination of protein content by near infrared spectroscopy. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 41, 65-69 (1994).
- 6) R. Narayan, G. S. Chauhan & N. S. Verma; Changes in the Quality of Soybean During Storage. Part 1-Effect of Storage on some Physico-chemical Properties of Soybean. *Food Chemistry*, 27, 13-23 (1998).