

図9 キャリブレーションモデル作成の流れ

トマトの吸光度二次微分スペクトルを用いる。まず、吸光度(図10)はリファレンス(テフロン球、直径50.8mm)とトマトのそれぞれのスペクトルデータから求められる。この吸光度から Savitzky-Golay 法⁴⁾(二次三次多項式適合二次微分)を用いて吸光度二次微分スペクトル(図11)を求める。

3.2 目的変数

目的変数にはトマトの糖度(単位:Brix%)を用いる。トマトの糖度を計測するために、あらかじめスペクトルデータを取得したサンプルを切断、すりつぶして果汁を採取し、手持ち屈折糖度計(アタゴ製 N-20E, 測定範囲:0.0~20.0Brix%, 最小目盛0.1Brix%) (図12)により計測した。屈折糖度計での糖度計測については液温により屈折率が変化するた



図12 屈折糖度計

め、糖度計測と同時に液温を測定し、屈折糖度計に付属している補正表を用いて温度補正を行った。

3.3 PLS 解析

本研究ではキャリブレーションモデルを作成するために PLS (Partial Least Squares) 解析を使用する。PLS 解析では、計算過程において逆行列を求める必要がないため、重回帰分析で問題になる多重共線性の問題を回避できる。そのため、説明変数の中から互いに相関のないように変数を選択する必要はないが、この PLS を用いてキャリブレーションモデルを作成するにあたり、最適な PLS ファクター数を決定する必要がある。これによりキャリブレーション用のデータからモデル作成に有効な情報を抽出でき、かつこのキャリブレーションモデルの予測性能が最適化される。ここではクロスバリデーションにより、最適な PLS ファクター数を求める。

3.4 クロスバリデーション

クロスバリデーションは、キャリブレーションモデルを作成するために用いたデータセットとは異なるデータセットを用いて、そのキャリブレーションモデルの予測性能を評価する方法である。この評価値として PRESS (Predicted Residual Error Sum of Squares: (1) 式) が用いられる。最適な PLS ファクター数は、その数を変化させながらクロスバリデーションによって PRESS を求め、その最小値を求めることにより得られる。また、同時に、クロスバリデーションによりキャリブレーションモデルの安定性の評価が可能である。モデルが安定であれば、図13に示すような、PLS ファクター数が増加するに従い、PRESS の最小値まで単調減少し、次に単調増加する。モデルが安定していなければ、図14のように複数の極小値をもつような結果が得られる⁵⁾。

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (1)$$

n : サンプル数 y_i : i 番目の実測値
 i : 1, ..., n \hat{y}_i : i 番目の推定値

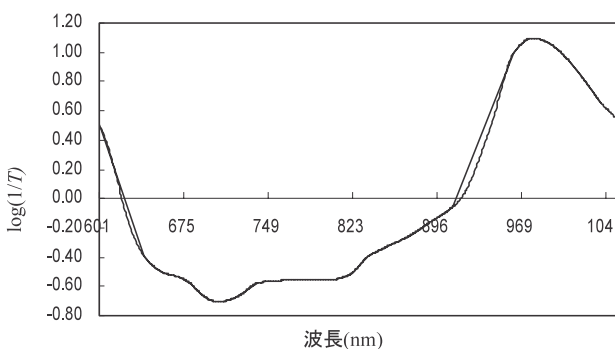


図10 吸光度スペクトル

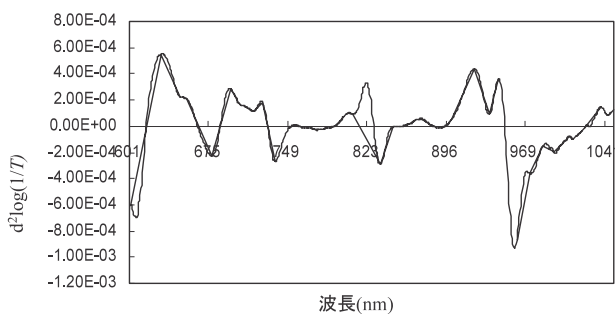


図11 吸光度二次微分スペクトル

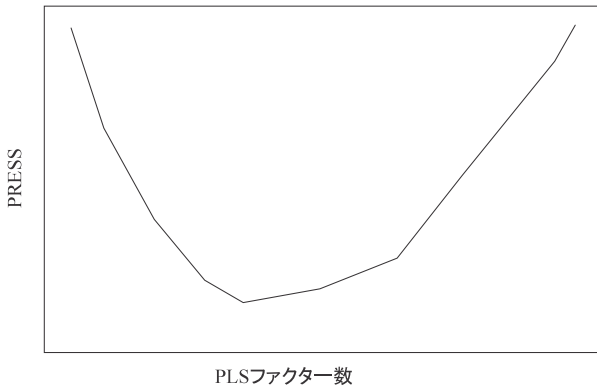


図 13 安定なキャリブレーションモデルの PRESS の例

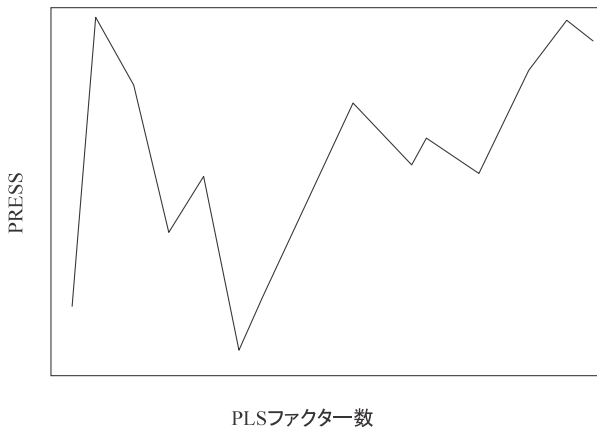


図 14 不安定なキャリブレーションモデルの PRESS の例

4. 評価実験

実験用のサンプルには、熊本県八代産のトマト（品種：桃太郎）を用いた。サンプル数は 64 個、糖度の最小値は 3.7 (Brix%)、最大値は 5.3 (Brix%)、平均値は 4.5 (Brix%)、標準偏差は 0.38 (Brix %) であった。図 15 にキャリブレーションに使用したトマトの温度補正済みの糖度分布を示す。

スペクトルの計測に際し、あらかじめリファレンス（テフロン球：直径 50.8mm）を用いてリファレンス計測を行った。マルチチャンネル分光器の露光時間は 19msec とした。ひとつのサンプルについてトマトの赤道部を一回りするようになり 10 点計測し、その各点において 16 回計測を行い、加算平均を行った。光源部では直線上に隣接する 3 個のハロゲンランプ

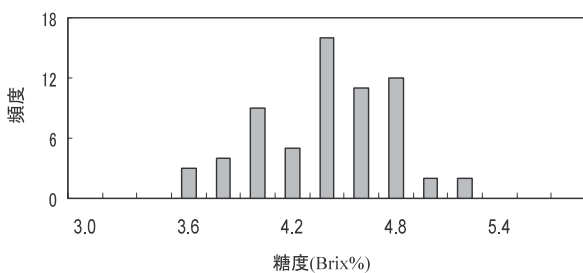


図 15 キャリブレーション用トマトの糖度分布

を点灯した。センサ受光側では集光用レンズと試料の間に拡散板、ND フィルタを配置した(図 7)。解析では 750~950nm の間で 5nm 間隔でサンプリングした 40 波長の吸光度二次微分スペクトルデータを説明変数とした。トマトの糖度の実測については、3.2 節の方法で行った。本実験では屈折糖度計の読み取り誤差を小さくするために一つのサンプルから採取した果汁に対して 5 回測定し、その平均値を目的変数とした。

4.1 結果

クロスバリデーションには、Leave-One-Out 法を用いた。ここで、Leave-One-Out 法について説明する。まず、 n 個のキャリブレーション用のサンプルから 1 個だけ取り出してバリデーション用のサンプルとし、 $(n-1)$ 個のサンプルでキャリブレーションモデルを作成する。次に、そのキャリブレーションモデルを用いて、バリデーション用のサンプルのスペクトルデータから糖度を推定し、実測値との残差を求める。この操作を n 個のキャリブレーション用サンプルデータのいずれもが 1 回だけバリデーション用サンプルのデータとなるように取り出してすべての残差を求め、これから PRESS の計算を行う。以上を PLS ファクター数を増加させながら行うことで最適な PLS ファクター数を求める。図 16 にクロスバリデーションの結果を示す。この図より、安定したモデルが作成されていることがわかる。この場合の PRESS の最小値を与える PLS ファクター数は 10 であった。図 17 にこの

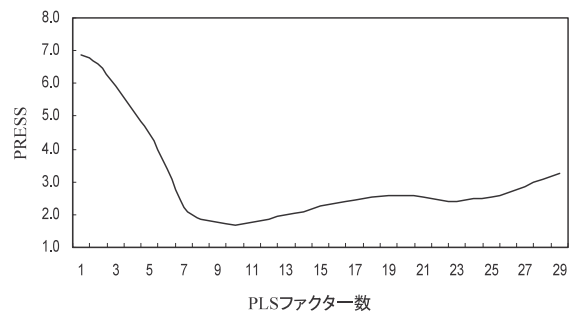


図 16 クロスバリデーション結果

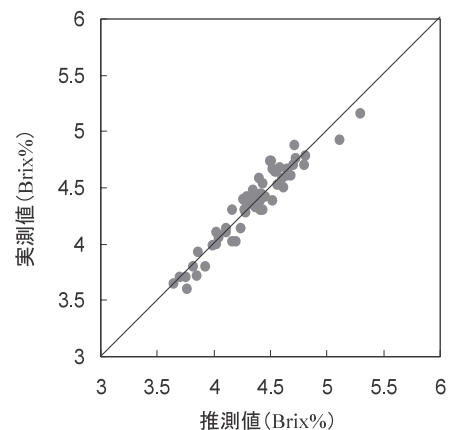


図 17 糖度実測値と推定値のプロット

PLS ファクター数の場合のキャリブレーションモデルでの実測値と推定値をプロットしたものを示す。このキャリブレーションモデルでは SEC (Standard Error of Calibration: (2)式) = 0.12 (Brix%), Bias ((3)式) = 0.00 (Brix%), R^2 (Coefficient of determination: (4)式) = 0.92 であった。

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-p-1}} \quad (2)$$

$$Bias = \frac{\sum_{i=1}^n e_i}{n} \quad (3)$$

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (4)$$

y_i : i 番目の実測値 \bar{y} : 推定値の平均
 \hat{y}_i : i 番目の推定値 e_i : 残差 $y_i - \hat{y}_i$
 \bar{y} : 実測値の平均 \bar{e} : 残差の平均
 n : サンプル数
 p : 自由度
 i : 1, ..., n

4.2 考 察

実験において得られた SEC の値は(2)式で表されるように、全体的にみたキャリブレーションでの誤差を表す。この値が小さいほど良いモデルが得られていると言える。Bias の値は実測値と推定値の偏差を表す。本解析の値は偏りが無いことを示している。また、 R^2 ($0 < R^2 < 1$) は実測値の変動と推定値の変動の割合を表し、この値が大きいくほど良いキャリブレーションモデルであると言える。以上、クロスバリデーションの結果とこれらの統計値から良好なキャリブレーションモデルを作成することができたと考える。しかし、今回の実験に用いたサンプルは、糖度の最小値と最大値の差が 1.7 (Brix %) しかなく、例えば糖度の実測値の誤差が 0.1 (Brix %) であれば、相対的に 6% 程度の誤差となるため、屈折糖度計の読み取り誤差の影響は大きくなる。またこのキャリブレーションモデルを作成した糖度の範囲以外ではこのモデルは使用できないため、計測システムの実用性を高めるためにも広い糖度範囲を網羅するようなサンプルを収集する必要があると考える。また、スペクトルデータにおいて、糖度推定にとってノイズとなる成分や、実験時における外乱要因による外れ値の除去については、クロスバリデーションでのモデルの安定性を指標に行ったが、統計的な手法を用いてスペクトルデータやサンプルの糖度データを分析し、効率を向上させることが望ましい。

5. ま と め

可視・近赤外光を用いてトマトの糖度を非破壊で計測するための計測装置およびデータ解析プログラムを作成し、トマトの糖度推定用のキャリブレーションモデルを作成して評価を行った。その結果、良好な結果が得られた。本報で報告した計測装置は、主に選果場での等級選別等に使用することを想定したものであるが、この他にも生産者がフィールドにおいて品質管理に使用することも想定される。現在、フィールドで使用可能な小型の糖度計測装置 (図 18) についても開発を行っている。今後は、実用段階を目指して、計測の精度と信頼性を向上させるための検討を進めていく予定である。



図 18 小型糖度計測装置

引用文献

- 1) 尾崎幸洋・河田 聡 編：近赤外分光法，学会出版センター (1996)
- 2) 相島鐵郎：ケモメトリックスー新しい分析化学ー，丸善 (1992)
- 3) David M. Haaland・Edward V. Thomas: Partial Least Squares Methods for Spectral Analyses. 1. Relation to Other Quantitative Calibration Methods and the Extraction of Qualitative Information, Anal. Chem. Vol.60, No.11, pp1193-1202 (1988)
- 4) Abraham Savitzky・Marcel J. E. Golay: Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures, Anal. Chem. Vol.36, No.8, pp 1627-1639 (1964)
- 5) Kenneth R. Beebe・Randy J. Pell・Mary Beth Seasholtz: Chemometrics A Practical Guide, John Wiley & Sons, Inc. (1998)