

透過測定による近赤外分光法を利用した北海道産醤油の非破壊成分分析

奥村幸広・山木 携・本堂正明

Nondestructive Analysis of Soy Sauce Made in Hokkaido
by Near Infrared Transmittance Spectroscopy

Yukihiro OKUMURA, Tazusa YAMAKI and Masaaki HONDO

Nondestructive rapid analysis for the determination of total nitrogen, soluble solids, salt content, and alcohol content in soy sauce was examined using near infrared (NIR) transmittance spectroscopy. Calibration equations were obtained by multiple linear regression of measured values and NIR absorbance values ($\log(1/T)$). Second derivatives of absorbances ($d^2 \log(1/T)$) were also used as well as $\log(1/T)$.

The standard errors of prediction (SEP) were 0.027g/100g for total nitrogen, 0.20° Brix for soluble solids, 0.19%w/v for salt content, and 0.14%v/v for alcohol content.

Assignment of selected wavelengths for calibration equations were confirmed by using an aqueous solution of polypepton-S, sodium chloride and ethanol as authentic spectra. It was suggested that wavelength selection should be based on its ability to withstand interference from other compounds rather than its sensitivity.

醤油製造において、その成分管理は、製品の品質を管理するうえで重要な項目である。無塩可溶固形分は、原料の発酵熟成過程における蛋白質や糖質などの分解とそれに伴う可溶性成分生成の指標として、全窒素は、うま味成分であるアミノ酸の概量を代表させる指標として、それぞれ重要な品質管理項目である。また、アルコール分は、もろみ中での酵母の生育状態、製品の微生物耐性に関して有用な情報源である。以上の観点から、これらの項目は、日本農林規格 (JAS) における格付け検査項目として指定されている。しかしながら、これらの成分値を把握するために必要な化学分析法は、熟練した操作を要したり、強酸・強アルカリなどを使用した危険な操作を伴うことが多い。また、長時間の実験操作が必要な場合もあり、リアルタイムでこれらの成分値を把握することは難しい。

近赤外分光法 (以下 NIR 法) は、1960年代に Norris らによって小麦蛋白質の分析法として食品分野に導入されて以来、様々な食品を対象として検討が進められてき

た¹⁾。NIR 法による食品の非破壊分析の特徴として、操作の簡便さ、測定の迅速さ、同時多成分分析が可能、危険な実験環境が不要、などがあげられ、食品加工における工程管理法としての潜在能力は非常に高い。

醤油成分に対する NIR 法の適用は、橋本らによって試みられており^{2)~4)}、この手法をもとにした自動分析システムの開発、ならびに JAS 格付け検査の一次スクリーニング手法としての導入がなされている^{5),6)}。ここで使用した NIR 分光装置は、「透過反射方式」による NIR スペクトル測定を採用しているが、醤油のように清澄性の高い試料の場合、Lambert-Beer の法則が成立する「透過方式」で測定することが可能であり、この方がより詳細な情報を得ることが期待できる。また、橋本らの装置は、20枚の干渉フィルターを使用して検量線を作成するもので、連続スペクトル測定することができない。連続スペクトルの測定が可能であれば、検量線で使用する波長の帰属について、さらに詳細な解析が可能となる。

以上の観点から、本研究では、試料に北海道産のこい

くちしょうゆを使用し、透過方式を使った連続 NIR スペクトルによる醤油成分の非破壊分析を試みた。

実験方法

1. NIR スペクトルの測定

NIR 分光光度計として NIR Systems 社の NIRS-6500 型を使用した。液体試料の透過スペクトルを測定するため、サンプル・トランスポート・モジュール、透過検出装置、温度調節装置を装備して実験を行った。試料は、水浴中で25℃に温度調整した後、石英キュベットセルに入れ、400nm から2500nm まで2 nm ステップで吸光度を測定し、これを連続透過スペクトルとして扱った。

取得した NIR スペクトルは、NSAS ソフトウェア (NIR Systems, Ver3.20) により、スムージング処理および二次微分処理を行った。以下、スムージング処理を行ったものを原スペクトル、二次微分処理を行ったものを二次微分スペクトルとする。

2. 試料

北海道内の醤油工場にて製造された JAS 格付け検査用いくちしょうゆを北海道味噌醤油技術会より提供していただいた。試料214点に関してそれぞれ NIR スペクトル測定と化学分析を行った。試料を107点ずつ2セットに分け、一方を検量線作成用に、もう一方を検量線評価用に使用した。それぞれのセットの基本統計量を表1に示した。

表1 試料の基本統計量

検量線作成用セット				
	全窒素	可溶固形分	食塩	アルコール
単位	g/100g	° BRIX	%w/v	%v/v
平均値	1.50	34.69	15.96	2.72
最小値	1.28	29.90	8.30	0.79
最大値	1.70	39.40	18.90	6.87
標準偏差	0.11	2.12	2.12	1.32
標本数	107	107	107	107

検量線評価用セット				
	全窒素	可溶固形分	食塩	アルコール
単位	g/100g	° BRIX	%w/v	%v/v
平均値	1.50	34.66	15.91	2.72
最小値	1.27	29.90	8.20	0.80
最大値	1.69	38.40	18.60	6.77
標準偏差	0.11	2.01	2.15	1.35
標本数	107	107	107	107

3. 化学分析法

一般成分分析はしょうゆ試験法に準じた⁷⁾。すなわち、全窒素はケルダール法により、可溶固形分測定は屈折計により、食塩濃度はモール法により、それぞれ測定した。

4. エタノール測定

エタノールはガスクロマトグラフィー (以下 GC) 法で測定した。内部標準として10% 2-Propanol 水溶液を使用し、内部標準液2 ml を試料液で10ml にメスアップしたものを GC に供した。GC 条件を下記に示した。

機器 : 日立263-70型

検出器 : FID

カラム : Porapak Q 80-100mesh (Waters)

ガラスカラム 3 mm×2 m

移動相 : He 30ml/min

温度 : カラム 145℃

インジェクター 210℃

検出器 210℃

内部標準 : 2-Propanol

5. 検量線の作成と評価

検量線の作成と評価には、NSAS ソフトウェア (NIR Systems, Ver3.20) を使用した。検量線作成セット試料の各波長における吸光度 (二次微分スペクトルの場合には二次微分値) を説明変数、化学分析値を目的変数とする重回帰分析を行い、変数増加法によって複数の検量線を作成した。作成した検量線に、検量線評価セットの試料を当てはめ、化学分析値との相関を検討した。

6. 標準物質の NIR スペクトル

Polypepton-S、塩化ナトリウム、エタノール (いずれも和光純薬) を標準物質として使用した。Polypepton-S は0.4~2 %w/v、塩化ナトリウムは4~20%w/v、エタノールは2~10%v/v の濃度で水溶液を調製し、25℃で NIR スペクトルを測定した。

実験結果および考察

1. 醤油の NIR スペクトルと光路長の設定

NIR Systems 6500型分光分析装置では、液体測定用キュベットセルとして、光路長1 mm から20mm まで5種類のセルを使用することができる。醤油のように清澄性の高い液体の場合、光路長に比例して吸光度は大きくなるため、光路長の大きいセルを使用した方が微量成分由来の情報が得られやすい。その反面、色素成分による可視光線の吸収や、水に由来する波長帯の吸収が大きくなり、成分値予測に支障をきたすことも予想される。そこで、適切な光路長を設定するため、光路長1 mm

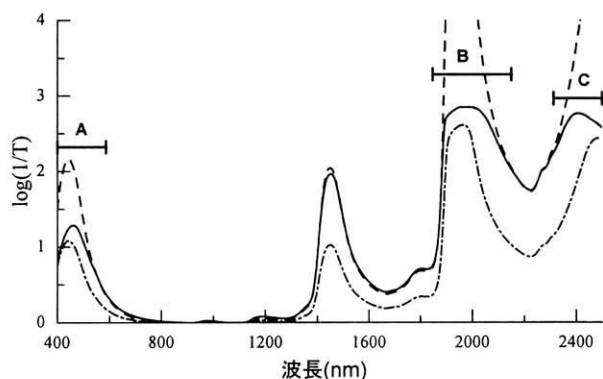


図1 光路長による醤油NIRスペクトルの変化

---光路長 1 mm, ——光路長 2 mm,
- · - · - 光路長 1 mmの吸光度を2倍したもの

と 2 mm のセルを使って醤油の NIR スペクトルを測定した。光路長に対する吸光度の線形性を調べるため、光路長 1 mm のスペクトルに対して、各波長の吸光度を 2 倍にしたスペクトルを計算し、光路長 2 mm のスペクトルと比較を行った。その結果、400~520nm (A)、1880~2110nm (B)、2330~2500nm (C)を除く範囲で、光路長に対する吸光度がほぼ線形であることが確認された。吸収帯 B および C は水に由来する吸収、A は醤油の色素成分による可視光の吸収と考えられる。2 mm セルを使用した場合、これらの波長域では吸光度が飽和しており、吸光度の線形性が失われていると考えられる。そのため、この周辺では成分由来の有用な情報が得られにくいと判断し、以後スペクトル測定には光路長 1 mm のキューベットセルを使用することとした。

2. 検量線の作成と評価

醤油試料214点に対して NIR スペクトルを測定し、原

スペクトルおよび二次微分スペクトルを得た。全試料に関して、従来法により全窒素、可溶固形分、食塩、アルコールの各成分値を測定した。このうち、検量線作成セット107点に関して、NIR スペクトルと各化学分析値による重回帰分析を行い、各成分値を予測するための検量線を作成した。作成した検量線は、検量線作成セットのみ適合している場合があり、未知試料に対して精度の高い検量線であるとは限らない。そこで、未知試料に対する予測精度を評価するため、検量線標準誤差 (SEC) の小さい検量線を複数個作成し、これらに検量線評価用セットの試料を当てはめて NIR 予測値を計算した。この計算値と従来法による分析値から、検量線予測標準誤差 (SEP) を計算し、この値の小さいものを精度の高い検量線として評価することとした。計算の結果、最も精度の高かった検量線に関して、精度と選択波長を表 2 に示した。また、検量線評価セットに関する NIR 値と化学分析値の相関プロットを図 2 に示した。

全窒素、食塩、アルコールに関しては、二次微分スペクトルを使うことにより、SEP はそれぞれ0.037から0.027、0.25から0.19、0.17から0.11と、原スペクトルよりも予測精度の高い検量線を作成することができた。これに対して、可溶固形分に関しては、二次微分スペクトルで SEP が0.28、原スペクトルで0.20と、原スペクトルを使用した方が予測精度は高かった。

3. 検量線選択波長の帰属

重回帰分析により検量線を作成する場合、化学成分とは無関係な波長が偶然選択されることがあり、その結果、未知試料に対して安定性の低い検量線になる場合がある。検量線の安定性を判断するという観点からも、選択した

表 2 NIR 法による醤油の成分分析検量線

分析項目	スペクトル	SEC	SEP	BIAS	選択波長(nm)		
全窒素	log(1/T)	0.041	0.037	0.0062	1420	2226	1784
	d ² log(1/T)	0.028	0.027	-0.0038	1720	1808	2300 1858
可溶固形分	log(1/T)	0.20	0.20	0.000	1888	1828	1188 1536
	d ² log(1/T)	0.28	0.27	0.017	1832	1176	2130 2284
食塩	log(1/T)	0.33	0.25	-0.032	1660	2306	1254 2178
	d ² log(1/T)	0.17	0.19	-0.038	1808	1206	2344 1476
アルコール	log(1/T)	0.17	0.18	0.032	2266	2208	432
	d ² log(1/T)	0.11	0.14	-0.018	1688	1888	2292 584

log(1/T) NIR の原スペクトル
 d²log(1/T) NIR の二次微分スペクトル
 SEC 検量線作成セットの標準誤差
 SEP 検量線評価セットの標準誤差
 BIAS 検量線評価セットの予測値残差の平均値

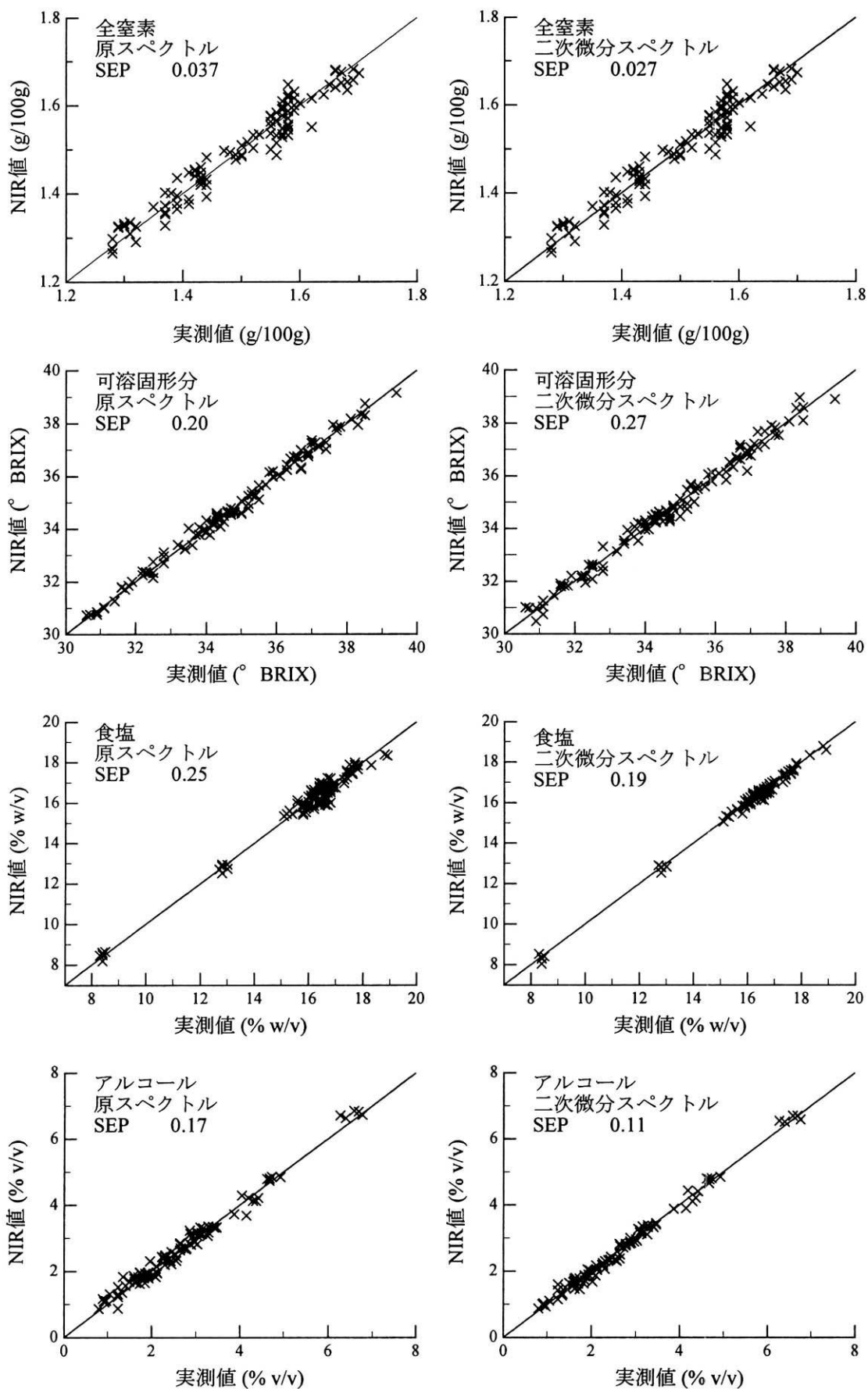


図2 検量線評価セットにおけるNIR値と化学分析値の相関

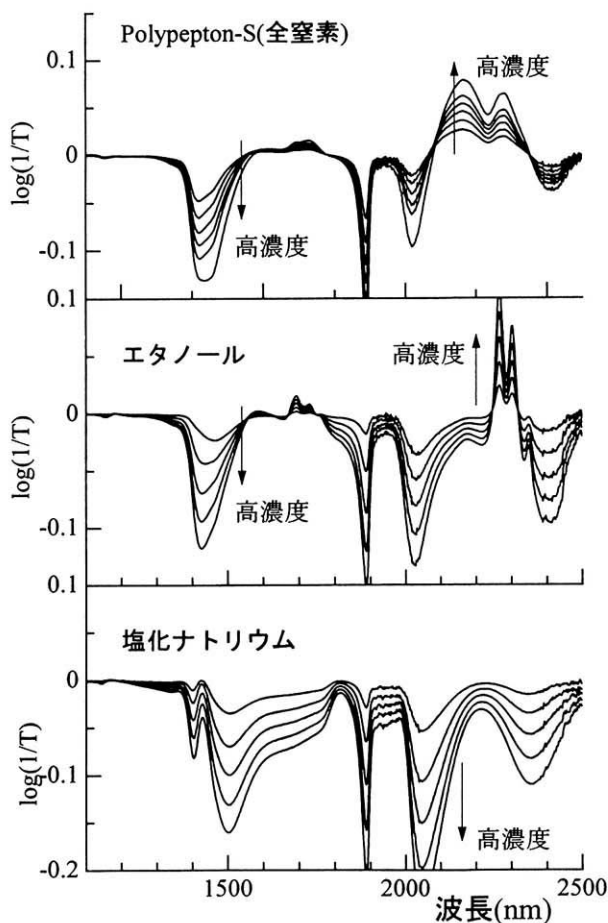


図3 標準物質のNIR差スペクトル

Polypepton-S	: 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 18, 2.0%w/v
エタノール	: 2, 4, 6, 8, 10%v/v
塩化ナトリウム	: 4, 8, 12, 16, 20%w/v

波長の帰属を行い、検量線を理論的に裏づけることは非常に重要である。

選択波長の帰属について検討するため、標準物質のNIRスペクトルを測定した。測定対象が水溶液系であることを考慮し、標準物質は水溶液あるいは懸濁液の状態でNIRスペクトルを測定した。全窒素の標準物質には、ダイズ蛋白質の加水分解物であるPolypepton-S(以下PPS)を使用した。水溶液系試料のNIRスペクトルは、溶媒である水の吸収が強いため、溶質に由来する吸収を観察することが難しい。そこで、これら標準物質と水のNIRスペクトルの差スペクトルを計算して検討した(図3)。

PPSの差スペクトルでは、特徴的なピークとして2162nmのペプチド結合またはアミノ基に由来するピーク、2280nmのアルキル基に由来するピークが検出された。他にも1690nmと1724nmにもアルキル基由来の微弱なピーク、1420nm、1890nm、2026nmに水に由来する負のピークが観測された。

エタノールでは、アルキル基に由来する2266nm(CH_3)と2300nm(CH_2)のシャープなピークが特徴的で、この他1690nmと1730nmにアルキル基由来の微弱なピーク、1428nm、1890nm、2026nmに水由来の負のピークが観察された。

塩化ナトリウムは、スペクトルを測定した全領域で吸光度が低下した。イオン結合性結晶は、固体状態ではNIR領域に吸収を持たないが、水溶液にすることによって、溶媒である水のスペクトルに変化が観察された。各波長における吸光度の変化と食塩の濃度との関係がほぼ線形であることから(データ省略)、水のスペクトル変化から食塩濃度を予測することは可能であると考えられた。

次に、検量線で選択した波長の帰属に関して検討した。

(1) 全窒素、原スペクトル

第一波長1420nm(図4a)には水に由来する負のピークがある。この領域は塩化ナトリウムによる影響が比較的低い領域であった。第二波長2226nm(図4c)はペプチド結合(アミノ基)由来のピークとアルキル基由来のピークの中間に当たる。感度はやや低いが、エタノールや塩化ナトリウムの影響が少ない領域であり、目的成分の感度よりも、妨害物質の影響の少ない波長が統計的に選択されたものと考えられる。

(2) 全窒素、二次微分スペクトル

第一波長の1720nm(図5a)は CH_2 伸縮に帰属され、塩化ナトリウムやエタノールの影響をほとんど受けない波長であった。第二波長1808nm(図5b)は塩化ナトリウムの感度が高く、第三波長2300nm(図5c)はエタノールの感度が高い波長で、これは他成分の影響を補正するように機能していると考えられる。

(3) 食塩

先に述べたように、食塩の情報はすべて水のスペクトル変化に由来すると考えられる。原スペクトルの第一波長1660nm(図4b)は、他成分に比べて塩化ナトリウムの感度が高い波長であった。第二波長以降(図4b, c)は妨害因子の補正に機能していると考えられる。二次微分スペクトルに関しては、第一波長1808nm(図5b)と第三波長2344nm(図5c)は、ともにPPSやエタノールの影響が非常に少ない波長であり、二次微分による検量線精度の向上に寄与していると考えられた。

(4) エタノール、原スペクトル

2266nm(図4c)の CH_2 由来の特徴的なピークが第一波長として選択された。この領域はPPSと塩化ナトリウムの影響も受けるため、第二波長以降(図4b)で

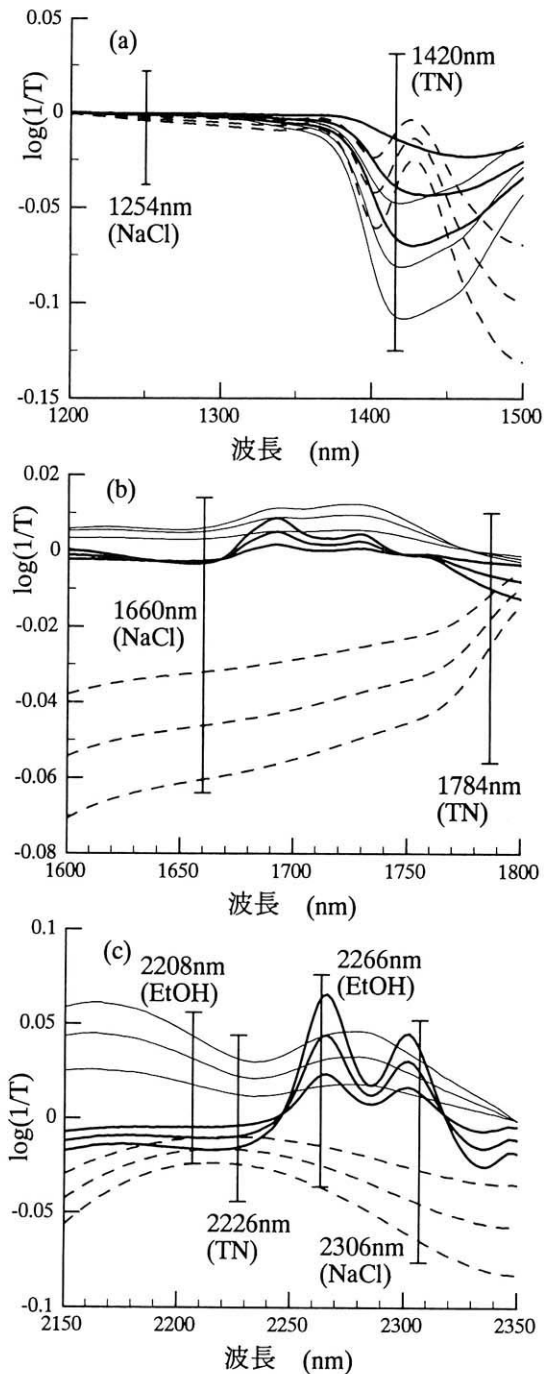


図4 標準物質のNIR差スペクトル (原スペクトル)

— エタノール (2, 4, 8%)
 ---- 塩化ナトリウム (8, 12, 16%)
 — Polypepton-S (0.6, 1.0, 1.4%)

補正する必要があったものと考えられた。

(5) エタノール, 二次微分スペクトル

第一波長1688nm (図5 a) は CH_3 由来と考えられ, エタノールの情報が高感度で得られる事が確認できた. この波長は PPS の影響も若干受けている. 2292nm (図5 c) は, エタノールにほぼ無相関で PPS と相関があるので, この波長で窒素成分による妨害を補正しているも

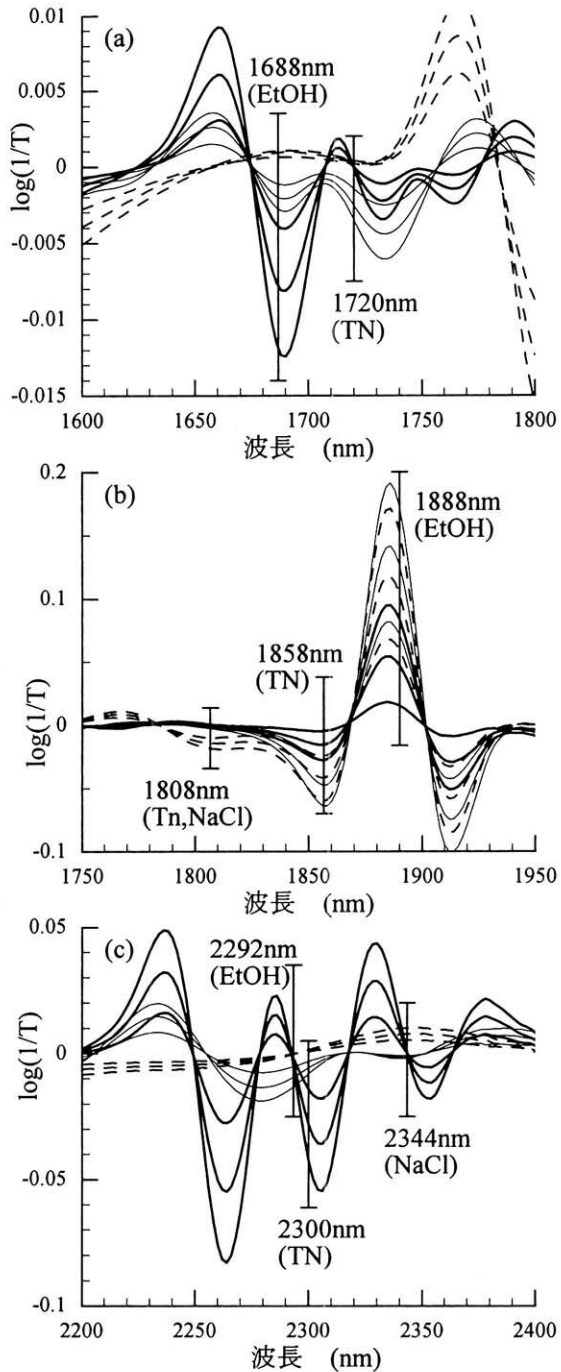


図5 標準物質のNIR差スペクトル (二次微分)

— エタノール (2, 4, 8%)
 ---- 塩化ナトリウム (8, 12, 16%)
 — Polypepton-S (0.6, 1.0, 1.4%)

のと考えられる。

要 約

近赤外分光法 (NIR 法) を利用して醤油一般成分の非破壊分析を試みた. 北海道の醤油工場で製造されたこいくちしょうゆ214点を利用し, 透過型 NIR 装置により連続スペクトルを取得し, 全窒素, 可溶固形分, 食塩,

アルコールに関して検量線を作成した。その結果、全窒素、食塩、アルコールに関しては、二次微分 NIR スペクトルを使用することにより、また可溶固形分に関しては原スペクトルを使用することにより、精度の高い非破壊分析が可能であった。検量線で使用した吸収波長と醤油中の化学成分との関連性を検討するため、所定の濃度に調整した標準溶液の NIR スペクトルを測定した。その結果、原スペクトルの場合、選択波長に複数の成分に由来する吸収が見られる事がおおく、重回帰分析によって複数の波長を選択することによって、妨害因子の影響を取り除いていると考えられた。これに対し、二次微分スペクトルの場合は、他成分の影響が比較的少ない波長が選択されており、このため精度の高い検量線が作成されたと考えられた。

文 献

- 1) 岩本睦夫・河野澄夫・魚住純：近赤外分光法入門，幸書房（1994）
- 2) 小林邦男・橋本彦亮：醬研，17，188（1991）
- 3) 飯塚佳子・小林邦男・岡田稔生・橋本彦亮：醬研，17，196（1991）
- 4) 小林邦男・飯塚佳子・岡田稔生・橋本彦亮：醬研，19，307（1993）
- 5) 田中秀夫・松本秀樹・鈴木邦明・兼松善範・篠部恭三・山田勝彦・大津宣明・橋本彦亮：醬研，20，195（1994）
- 6) 日本醤油検査協会・日本醤油研究所編：NIR による醤油の JAS 分析ハンドブック，（1993）
- 7) 日本醤油研究所編：しょうゆ試験法，（1985）