

貯蔵がリンゴ果実の近赤外スペクトルに及ぼす影響

伊豫知枝*・河野澄夫

食品総合研究所 305-8642 つくば市観音台2-1-12

Predicting Brix Values of Stored Apples using Near Infrared Spectra

Chie Iyo* and Sumio Kawano

National Food Research Institute, Kan-nondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

Summary

Sweetness sorting machines, based on near infrared (NIR) spectroscopy, have been introduced to packinghouses for peaches, apples, oranges, and other fruits for nondestructive quality evaluation. However, the NIR method for Brix values is not always calibrated well, so that a big bias occurs occasionally. In this study, the means of developing a universal calibration for Brix using non-stored apples, which is also suitable for stored samples, was explored. The calibration developed, using NIR spectra [not the multiplicative scatter correction (MSC) one], predicted the Brix values of non-stored samples well but not that of stored ones. With the 5-month stored apples, a bias of 2.66° Brix occurred. However, there was no bias when the spectra of non-stored and stored samples were used to formulate the calibration equation. When calibration and prediction using MSC-treated spectra were performed, the drawback described above could be mitigated. More accurate results were obtained using NIR spectra within 758 to 1161 nm.

Key Words: apples, Brix value, multiplicative scatter correction (MSC), NIR, nondestructive quality evaluation.

緒言

近赤外分光法を用いた糖度選別機が実用化され、リンゴ、ナシおよびウンシュウミカンなどの選別を目的として農協などの選果場に導入されているが、糖度測定用検量線の維持・管理が重要な課題となっている(河野, 2000)。

糖度選別機は近赤外分光法の原理を応用した装置であるため、近赤外スペクトルデータから糖度を算出するためには、それらと関係づける検量線が必要である。通常、検量線の開発には今後選別するであろう果実(母集団)を代表する試料(標本)を用いることが基本となっている(岩元ら, 1994 a)。しかし、糖度選別機の検量線の開発において必ずしもこの基本が満足されているとはいえない状況にある(河野・伊豫, 2000, 未発表)。すなわち、試料の性状を変動させる要因としては、品種、産地、収穫時期、品温、貯蔵などが挙げられ、安定した検量線を得るにはこれらすべての要因に変動を有する試料を用いることが不可欠である。貯蔵以外の要因についてはある程度検量線作成に取り込まれているが、貯蔵については、試

料の入手に長期間を必要とすることから、ほとんど考慮されてこなかった。特に、リンゴの場合、年間にわたって市場に供給するため収穫時以外は低温貯蔵が一般化しており(伊庭ら, 1985)、貯蔵による検量線の精度に及ぼす影響が懸念される。

そこで、本研究では、リンゴ果実を供試材料とし、糖度選別機の精度の維持および安定化を図ることを目的に、貯蔵の果実スペクトルに及ぼす影響およびその対策について検討した。

材料および方法

1. 材料

市場より購入した、青森県産リンゴ‘ふじ’果実で、購入直後(貯蔵直前)の果実および、1998年12月より1ヶ月、3ヶ月、5ヶ月間貯蔵した果実を供試した。貯蔵温度は5℃とし、段ボール箱および塩化ビニル製のトレイを用いた購入時の梱包方式で貯蔵を行った。予め、損傷果は試料より取り除いた。貯蔵直前、1ヶ月、3ヶ月、5ヶ月貯蔵した試料について近赤外スペクトルの測定および対照値の測定を行った。

2. スペクトルの測定

リンゴ果実の近赤外スペクトルの測定は、モモ果実の

2000年7月3日 受付。2001年1月5日 受理。

本研究概要は園芸学会平成11年度秋季大会で発表した。

*Corresponding author.

スペクトル測定方式と同様 (Kawano ら, 1992), インタラクタンス法により行った. すなわち, インタラクタンス方式の光ファイバーのプローブ端面に果実赤道部表皮が接触するように試料を置き, カバーを被せて遮光した状態でスペクトルを測定した. スペクトルの測定には分散型近赤外装置 (NIRSystems 社, 6250) を用いた. 測定波長領域は 680 nm~1235 nm, 波長スキャン回数は 50 回とし, リファレンスにはテフロン球 (直径 8 cm) を用い, 5 試料毎にリファレンスの測定を行った. スペクトル測定時の試料の温度は 25 °C とした.

3. 果実の Brix の測定

近赤外スペクトルの測定とともに, 果実の Brix, 貯蔵による果実の減量率, 果肉硬度を測定した.

Brix は, 近赤外スペクトルを測定した部位から厚さ 1 cm の切片を指で圧搾して得られた果汁をデジタル式糖度計 (アタゴ社製) で測定した. 2 回測定を行い, 平均値をもって Brix の値とした.

4. スペクトルの解析

スペクトルデータの取得は近赤外装置に内蔵されたソフトウェア (NSAS ver. 3.06, NIRsystems 社製), 並びに検量線作成, 主成分分析 (PCA) およびスペクトルの散乱補正 Multiplicative scatter correction (MSC) 処理は汎用ソフトウェア (Unscrambler ver. 7, CAMO 社製) により行った.

結果および考察

1. 貯蔵によるスペクトルの変化

各実験区の果実の平均スペクトルを第 1 図に示した. 同スペクトルは貯蔵により上下にシフトした. すなわち,

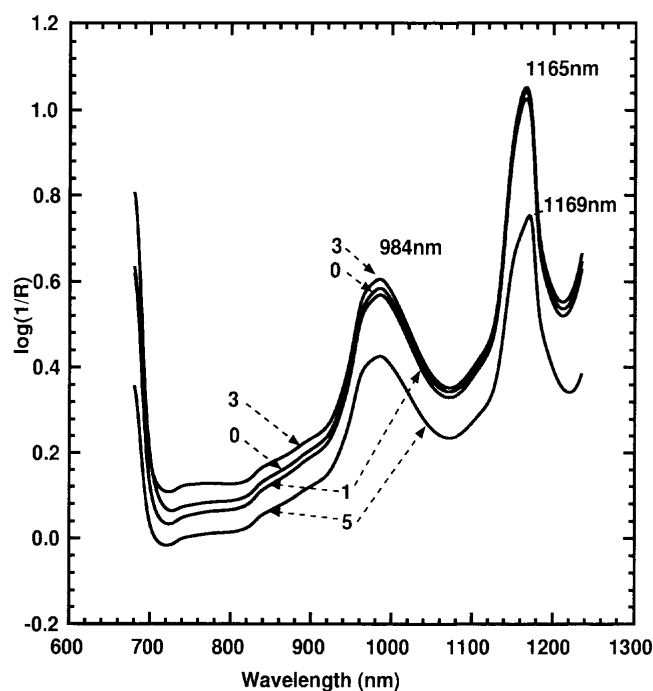


Fig. 1. NIR mean spectra of apples stored for different periods: 0, before storage; 1, one-month storage; 3, 3-month storage; 5, 5-month storage.

1ヶ月貯蔵区では下方へ, 3ヶ月貯蔵区では上方へ, そして5ヶ月貯蔵区では再度下方へシフトした. 5ヶ月貯蔵区のシフトは他と比較して著しく大きかった. 5ヶ月貯蔵区では水の吸収バンドにおいてスペクトルの変形が観察された. 5ヶ月貯蔵区の下へのシフトは波長が長くなるにつれて大きくなり, 水の吸収バンド近傍 (986 nm および 1161 nm) では著しく大きくなった.

貯蔵によるスペクトルの変化を更に明確にするため, 原スペクトル (700 nm~1235 nm) を用いて主成分分析を行ったところ, スペクトルデータの分散が最も大きくなる第 1 主成分軸 (PC1) および第 2 番目に分散が大きくなる第 2 主成分軸 (PC2) からなる平面において (第 2 図), 各実験区の試料の散布位置がそれぞれ異なった. 貯蔵前区に比べ 1ヶ月貯蔵区の散布位置は第 2 主成分の負の方向へ移動し, 3ヶ月貯蔵区はそれと反対の正の方向へ移動した. 5ヶ月貯蔵区のそれはこれらの動きと異なり第 1 主成分の負の方向および第 2 主成分の正の方向へ移動した. 第 1 主成分および第 2 主成分はスペクトル変動において異なった特徴を示すことから, 5ヶ月貯蔵区の試料においては 1ヶ月および 3ヶ月貯蔵区の試料とは異なった変化が起きているものと考えられた.

2. 貯蔵前区のスぺクトルからの検量線の作成

貯蔵前区の実験区検量線作成用試料 (n=93) の近赤外スペクトルおよび Brix 値をもとに Partial least squares (PLS) 回帰分析を行った. 解析に用いた波長領域は試行錯誤の結果 850 nm~1200 nm とし, スペクトルの前処理は各スペクトルから平均スペクトルを差し引く mean-center とした. 得られた PLS 回帰式は検量線評価用試料 (n=45) で評価した. 検量線作成用試料および評価用試料の構成を第 1 表に, そ

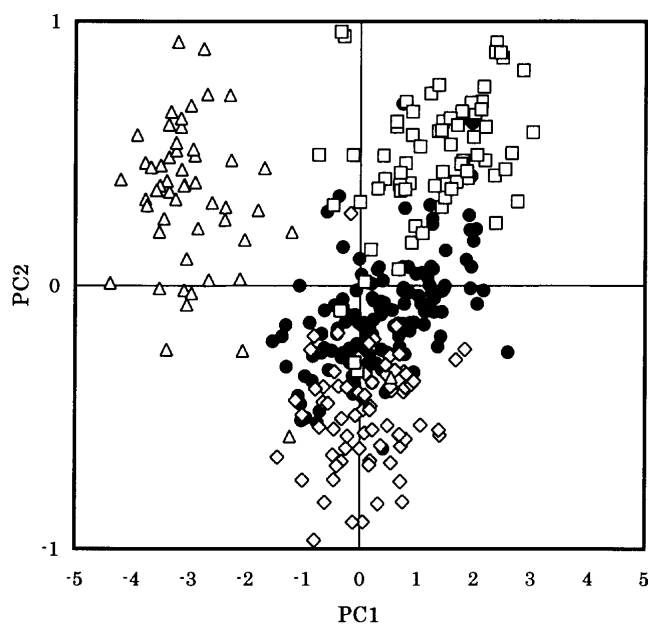


Fig. 2. Scatter diagram of samples on the plane with axis of the first and second principal components (PC1, PC2). ●: before storage, ◆: one-month storage, □: 3-month storage, △: 5-month storage.

Table 1. Characteristics of calibration and prediction sample sets for making calibration equation of Brix value using non-stored samples.

Months of storage	Sample set	n	Range	Mean	SD ^z
0	Calibration	93	11.20–17.95	13.59	1.19
0	Prediction	45	11.55–17.15	13.75	1.17
1	Prediction	75	10.50–15.40	13.19	1.17
3	Prediction	79	10.15–14.50	12.43	1.00
5	Prediction	60	10.10–14.55	12.03	0.98

^z Standard deviation.**Table 2.** PLS calibration, using non-stored samples, for determining Brix value and prediction of non-stored and stored samples.

Sample set	Calibration ^z			Months of storage	Prediction			
	Factor	R ^y	SEC ^x		0	1	3	5
Non-stored apples	12	0.97	0.27	SEP	0.35	0.49	0.42	1.40
				Bias	0.16	0.08	-0.08	2.66

^z This calibration equation was called “calibration equation-A” in the text.^y Multiple correlation coefficient.^x Standard error of calibration.**Table 3.** PLS calibration and prediction, using non-stored and stored samples.

Sample set	Calibration ^z			Months of storage	Prediction				
	Factor	R ^y	SEC ^x		All	0	1	3	5
All apples	11	0.97	0.29	SEP	0.37	0.42	0.29	0.30	0.29
				Bias	-0.11	-0.09	-0.14	-0.10	-0.14

^z This calibration equation was named “calibration equation-B” in the text.^y Multiple correlation coefficient.^x Standard error of calibration.

の解析結果を第2表に示した。説明変数として12個のファクターを有するPLS回帰式で最も良好な精度が得られ、その場合の予測標準誤差、SEP [Standard error of prediction: 近赤外法による推定値と従来法 (実測値) による分析値との残差から残差の平均値を引いた値の標準誤差] は 0.35° Brix であった。以後、ここで得られた検量線を“検量線-A”と呼ぶ。検量線-Aを用いて1ヶ月、3ヶ月、5ヶ月貯蔵区の果実糖度を予測した結果を第2表に併記した。1ヶ月および3ヶ月貯蔵区ではSEPが多少小さくなったもののバイアスの発生は観察されなかった。ここでいうバイアスとは、近赤外法による推定値の平均値から従来法による分析値の平均値を引いた値である。5ヶ月貯蔵区ではSEPが 1.40° Brix およびバイアスが 2.66° Brix となり、検量線の不適合が発生した。その理由として、検量線-Aの中には第1図の水の吸収バンドで観察される貯蔵によるスペクトルの変化に関する情報は含まれていないためと考えられた。

3. 貯蔵前区および各貯蔵区の統合スペクトルからの検量線の作成

貯蔵前および1ヶ月、3ヶ月、5ヶ月貯蔵区の各スペクトルを統合したスペクトル (統合スペクトル) および Brix をもとに PLS 回帰分析を行った。合計で検量線作成用試料は183個、および検量線評価用試料は150個であった。解析に用いた波長領域は試行錯誤の結果 $820\text{ nm} \sim 1200\text{ nm}$ とし、スペクトルの前処理は mean-center とした。得られた PLS 回帰式は検量線評価用試料で評価した。その解析結果を第3表に示した。説明変数として11個のファクターを有する PLS 回帰式で最も良好な精度が得られ、その場合の SEP は 0.37° Brix であった。以後、ここで得られた検量線を“検量線-B”と呼ぶ。検量線-Bを用いて、1ヶ月、3ヶ月、5ヶ月貯蔵区の果実糖度を予測した結果を第3表に併記した。検量線-Bは各貯蔵区への適合性が良好で、SEP は 0.42° Brix 以下、バイアスは 0.14° Brix 以下であった。バイアスの *t* 検定の結果、有意ではな

かった。

汎用検量線を作成する方法として母集団の異なるスペクトルを統合する方法は、ウンシュウミカンの温度補償型検量線の開発 (Kawano ら, 1993) および生乳の成分分析における複数の試料セル (試験管) の使用を可能にする試料セル補償型検量線の開発 (Chen ら, 1999) などに既に応用されているが、同法は貯蔵によるバイアス発生の問題を解決する方法および SEP の低減法としても有効であることが明らかとなった。

4. 貯蔵前区のスぺクトルからの汎用検量線の作成

実用の観点からは、貯蔵前のスペクトルから開発した検量線を貯蔵後の試料にも適用できれば便利である。そこで、貯蔵により変化したスペクトルを貯蔵前のそれに重なるように補正し、補正したスペクトルから各実験区の果実糖度を予測する方法の可能性について検討した。スペクトルの補正方法としては MSC 処理を採用した (岩元ら, 1994b)。MSC 処理とは、散乱状態の変化など

によるスペクトルのずれをスペクトルを平行移動および回転させることにより基準とするスペクトルに合わせ込む計算方法である (Stark, 1989)。

まず、解析に用いる波長領域により解析結果が左右されることから、MSC 処理を行う波長の選択を行った。貯蔵前の平均スペクトルの吸光度 (x 軸) と各貯蔵区の平均スペクトルの吸光度 (y 軸) との関係 (以後、平均スペクトルの相関図という) を第 3 図に示した。1 つの点は、各波長におけるそれぞれの平均スペクトルの吸光度である。y 軸に貯蔵前の平均スペクトルの吸光度をとってプロットすると、そのプロットは直線関係になるが、貯蔵が進行するにつれて第 3 図 (a)~(c) のように、1 本の直線ではなく 2 本に分かれたり、曲がったりした。これらの非直線性は、MSC 処理ではこのプロットを直線回帰することから、最終的には検量線による予測値に誤差を生じる原因となる。そこで、最も変形の著しい第 3 図 (c) より、MSC 処理を行う波長領域の選択を行った。直線が折れ曲がる点に注目し、(1) 680 nm~1235 nm (全波長域)、(2) 758 nm~1235 nm、(3) 758 nm~1214 nm、(4) 758 nm~1161 nm、(6) 758 nm~984 nm の領域について、また、5 ヶ月

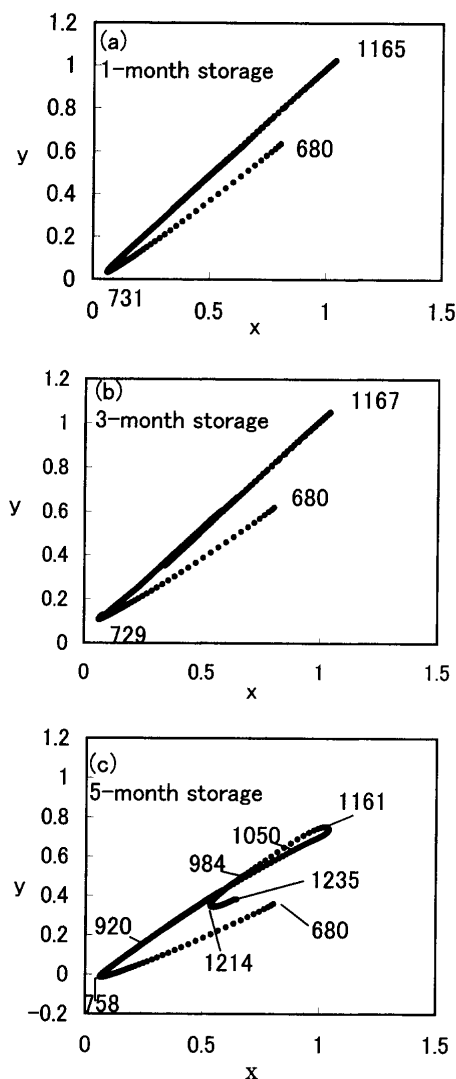


Fig. 3. Plots of the mean log (1/R) as y-axis for 1-month, 3-month and 5-month stored samples versus the mean log (1/R) as x-axis for non-stored samples for points through 680 nm to 1235 nm of NIR spectra.

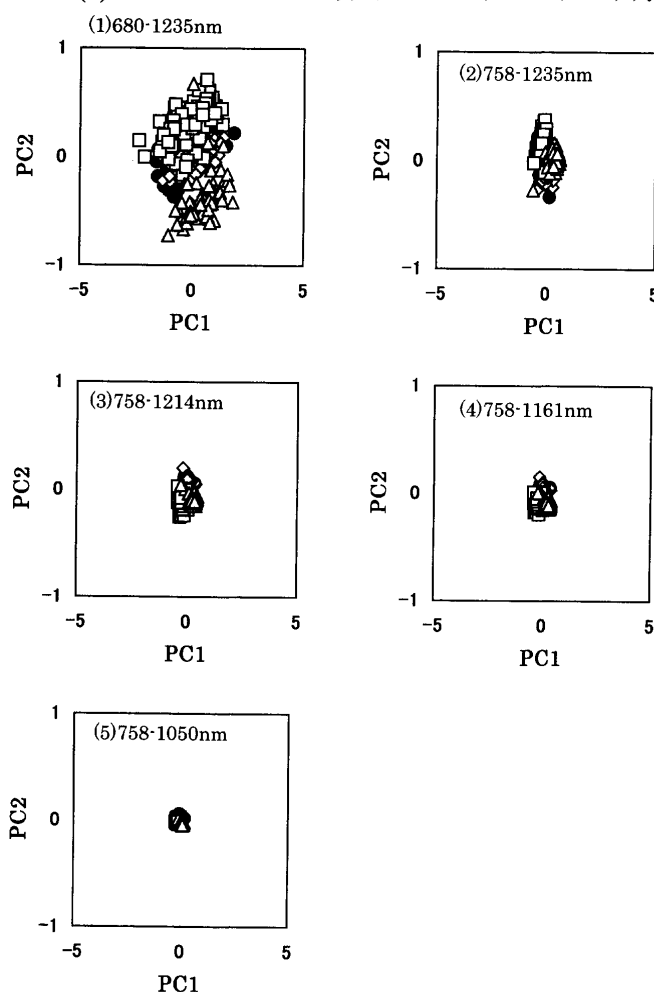


Fig. 4. Scatter diagram of samples on the plane with axis of the first and second principal components (PC1, PC2). All samples were corrected by MSC treatment. ● : before storage, ◇ : one-month storage, □ : 3-month storage, ▲ : 5-month storage.

貯蔵区で観察される 1161 nm の水の吸収バンドを除いた区として (5) 758 nm~1050 nm の領域について、さらに、糖の吸収バンドの近傍に波長領域を制限した (7) 758 nm~920 nm の領域についてそれぞれ MSC 処理を行った。

各波長領域で MSC 処理を行ったスペクトルデータを用いて主成分分析を行った。その結果を第 4 図に示した。同図に示すように、採用波長領域を (1) から (5) へと制限するにつれて、第 1 主成分軸および第 2 主成分軸からなる平面における各実験区の試料の分布は小さくなった。特に (1) と (2) の間、および (4) と (5) の間でその分布が著しく減少した。(5) から (7) においてはほとんど変化は見られなかった(データ省略)。(1) から (2) および (4) から (5) の間で、試料の分布が著しく減少する理由は次の様に考察される。前者の場合、傾きの異なる 2 本の直線で示される吸光度のプロットが 1 本の直線で示されるようになり、MSC 処理変換がより正確に行えるようになったこと、後者の場合、貯蔵によって吸光度が大きく変化する水の吸収バンドを除くことにより直線回帰の適合度が上昇したことのためと考えられる。

PLS 回帰分析では、貯蔵前区のスベクトルデータを基に検量線を作成し、得られた検量線を用いて各貯蔵区の測定精度の評価を行い、その結果を第 4 表に示した。すなわち、まず貯蔵前区のスベクトルデータに MSC 処理を施

し、得られた MSC 処理スペクトルデータを基に検量線を作成した。また、MSC 処理時に得られる MSC モデル式を用いて各貯蔵区のスベクトルを、貯蔵前の平均スペクトルに合わせ込む処理を行い、得られた各貯蔵区の MSC 処理スペクトルデータを用いて予測を行った。スペクトルの MSC 処理を行うことにより、検量線-A で見られた検量線の不適合は軽減された。すなわち、(1) の全波長域の 680 nm~1235 nm を用いる場合、検量線-A の 5 ヶ月貯蔵区で発生した大きな SEP、およびバイアスは解消し、それぞれ 0.72, 0.41° Brix と比較的小さな値となったが、3 ヶ月貯蔵区のそれが相対的に大きな値となった。680 nm~1235 nm の波長領域では平均スペクトルの相関図が 2 本の線に分かれることから MSC 変換が正確に行われないうえと考えられた。解析に用いる波長領域を狭くするにつれ、相関図が 1 本の直線で示されるようになり、直線性が向上した。これに伴い、検量線の各貯蔵区への適合性が向上した。相関図が完全な 1 本の直線で回帰できる (4) 758 nm~1161 nm の場合、最も良好で安定した結果が得られ、各実験区の SEP は 0.39~0.52° Brix、バイアスは 0.01~ -0.62° Brix の範囲になった。(3) の 3 ヶ月貯蔵試料でのバイアス -0.85° Brix と (4) の 3 ヶ月のバイアス -0.33° Brix との間で対応のある場合の平均値の差の検定を行った結果、危険率 5% で有意であると判定された。

Table 4. PLS calibration, using MSC treated spectra of non-stored samples, for determining Brix values and prediction of non-stored and stored samples.

Wavelength range	Calibration			Months of storage	Prediction			
	Factor	R^2	SEC ^x		0	1	3	5
(1) 680-1235 nm	9	0.93	0.46	SEP Bias	0.56 0.15	0.59 0.11	0.81 -0.63	0.72 0.41
(2) 758-1235 nm	8	0.94	0.40	SEP Bias	0.57 0.14	0.56 -0.04	0.72 -1.31	0.61 0.14
(3) 758-1214 nm	9	0.96	0.37	SEP Bias	0.51 -0.09	0.51 -0.06	0.57 -0.85a ^w	0.67 -0.95
(4) 758-1161 nm ^z	10	0.97	0.30	SEP Bias	0.49 0.01	0.44 -0.09	0.39 -0.33b	0.52 -0.62
(5) 758-1050 nm	6	0.95	0.37	SEP Bias	0.55 0.06	0.48 -0.16	0.58 -1.06	0.44 -0.01
(6) 758-984 nm	6	0.95	0.40	SEP Bias	0.57 0.01	0.58 0.13	0.53 -1.69	0.53 -0.02
(7) 758-920 nm	5	0.95	0.38	SEP Bias	0.57 0.06	0.59 0.20	0.57 -1.44	0.53 0.17

^z This calibration equation was called "calibration equation - C" in the text.

^y Multiple correlation coefficient.

^x Standard error of calibration.

^w a and b indicate significant at $P=0.05$ by t -test, respectively.

更に波長範囲を狭くした場合についても解析を行ったが、3ヶ月貯蔵区で大きなバイアスが発生した。この原因について、第3図の相関図から考察を行った。すなわち、第3図の(a)から(c)において、758 nm~1050 nmの波長領域における吸光度の対応する点の部分を拡大して観察してみると、1ヶ月貯蔵区および5ヶ月貯蔵区では上に凸のプロットを示したが、3ヶ月貯蔵区では下に凸のプロットを示した。このプロットの曲がり方の違いが直線回帰の際の誤差の発生形態に影響を及ぼし、ひいてはバイアス発生に結びついたものと考えられた。また、スペクトルの情報を絞りすぎたことも影響しているものと考えられた。

(4) 758 nm~1161 nmの波長領域を用いた検量線において、最も良好な結果が得られた。この検量線を“検量線-C”と呼ぶ。検量線-Cは検量線-Bに比べ3ヶ月および5ヶ月貯蔵区で多少バイアスが大きくなったが、検量線-Aに比べ各貯蔵区への適合性が向上した。

以上のことより、平均スペクトルの相関図においてプロットが直線となる758 nm~1161 nmの波長範囲で、貯蔵前の平均スペクトルを基準としたMSC処理をすることにより、貯蔵前区のスペクトルを用いて開発される検量線の貯蔵区への適合性を向上できることが明らかになった。

摘 要

糖度選別機の糖度測定精度の維持および安定化を図ることを目的とし、貯蔵が果実スペクトルに及ぼす影響およびその対策について検討し、次の結果を得た。

(1) 貯蔵によりリンゴ果実の近赤外スペクトルは上下にシフトした。

(2) スペクトルを主成分分析した結果、貯蔵前区、1ヶ月貯蔵区、3ヶ月貯蔵区および5ヶ月貯蔵区の第1主成分軸および第2主成分軸からなる平面における散布位置が異なった。貯蔵前区に比べ1ヶ月貯蔵区は第2主成分軸の負の方向に、3ヶ月貯蔵区は第2主成分軸の正の方向に、そして5ヶ月貯蔵区は第1主成分の負および第2主成分の正の方向に分布した。

(3) 貯蔵前の試料を用いてBrixの検量線を作成したと

ころ予測標準誤差(SEP) 0.35° Brixの良好な結果が得られた。しかし、この検量線による5ヶ月貯蔵区の予測結果では検量線の不適合が発生した。そこで、全試料を統合して検量線を作成したところ、測定精度が高く適合性のよい検量線が得られた。

(4) 各貯蔵区のスペクトルを貯蔵前区の平均スペクトルへ合わせ込むMSC処理を行うことにより、スペクトルの上下シフトが軽減できた。

(5) MSC処理をしたスペクトルを用いることにより、各貯蔵区への適合性の高い検量線の開発が可能となった。

引用文献

- Chen, J., C. Iyo, S. Kawano and F. Terada. 1999. Development of calibration with sample cell compensation for determining the fat content of unhomogenised raw milk by a simple near infrared transmittance method. *J. Near Infrared Spectrosc.* 7: 265–273.
- 伊庭慶昭・福田博之・垣内典夫・荒木忠治. 1985. 果実の成熟と貯蔵. p. 304–308. 養賢堂. 東京.
- 岩元睦夫・河野澄夫・魚住 純. 1994a. 近赤外分光法入門. 近赤外分光法の理論. p. 59. 幸書房. 東京.
- 岩元睦夫・河野澄夫・魚住 純. 1994b. 近赤外分光法入門. データ処理法. p. 74. 幸書房. 東京.
- 河野澄夫. 2000. 品質も味の時代-糖度選別機の現状と課題-. 農流技研会報. 242: 5–7.
- Kawano, S., T. Fujiwara and M. Iwamoto. 1993. Non-destructive determination of sugar content in satsuma mandarin using near infrared (NIR) transmittance. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 62: 465–470.
- Kawano, S., H. Watanabe and M. Iwamoto. 1992. Determination of sugar content in intact peaches by near infrared spectroscopy with fiber optics in interactance mode. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 61: 445–451.
- Stark, E. 1989. Data processing for near infrared spectroscopy. The proceed. the 2nd Intern. NIR Spectrosc. Conf. p. 38–64.