

氏名	Dheni Mita Mala		
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	博 甲 第 8164 号		
学位授与年月日	平成 29年 3月 24日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Development of Fluorescence Fingerprint (FF) Monitoring System for Microbial Content of Meat (肉中微生物の蛍光指紋法によるモニタリングシステムの開発)		
主査	筑波大学教授	博士 (農学)	北村 豊
副査	筑波大学教授	博士 (生物工学)	楊 英男
副査	筑波大学教授 (連携大学院)	工学博士	杉山 純一
副査	筑波大学准教授	博士 (農学)	吉田 滋樹

論 文 の 要 旨

食品産業の現場での生菌数計測は 48 時間の培養後に結果が示される好気性プレート計測法 (以下 APC) により行われているが、本法は時間と労力を要し主観的な側面もある。これに対してスペクトルスコピー (分光法) は、迅速かつ非破壊の検出解析法として知られ、APC の問題を解決する適切な技法として着目されている。特に蛍光分光法は高い感度と特異性を有し、複雑な組成の食品の微量蛍光物質を検出できる。中でも蛍光指紋法 (fluorescence fingerprint、以下 FF) は、連続的励起波長により得られる蛍光分光値であり、感度と選択性、迅速性が優れる定性的および定量的な非破壊測定法として知られている。しかし FF データは典型的な 3 次元の複雑なものであり、その直接的な解釈は困難である。そこで審査対象論文では FF の解析に部分最小二乗解析 (partial least squares regression、以下 PLSR) が用いられた。PLSR は簡単かつ誤差の少ない検証が可能であるので実用性が高く、食品における多変量分光データと品質パラメータの回帰分析を行うのに最適な手法である。

審査対象論文は、食肉表面の生菌数計測を FF により行うための知見を得るために行われた研究をとりまとめたものであり、大きく 3 つの異なる手法により検討されている。すなわち緩衝溶液中の微生物から放出される蛍光物質からその生菌数推定が試みられ、続いて代謝分泌物に基づく生菌数の予測、そして最後に光ファイバーを用いた FF による牛肉表面生菌数の間接的な推察が行われた。

まず第 1 章で著者は研究の背景と目的を述べ、第 2 章では FF を用いた微生物固有の蛍光物質を調査し、*E. coli* との相関を FF によって $R^2=0.88$ で求めている。その予測値の交差検証における平均二乗誤差 (RMSECV) は、FF による誤差が $0.78 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ と低く、精度の良い予測が可能であることが示された。加えて緩衝液により希釈された牛肉付着の微生物数もまた高い精度 ($R^2=0.97$, $\text{RMSECV}=0.7$) で予測できることが示された。PLSR モデルの VIP (Variable importance of projection) スコアは相対的に高く、2 つの代謝蛍光物質すなわちポルフィリンとフラビンの FF ピークと一致した。このことから食肉上の微生物

物代謝による内因性蛍光物質の自己蛍光変化が、FF データセットから生菌数を予測するための PLSR モデルに反映でき、これらの蛍光物質が生菌数と代謝産物の関係を明らかにされることが示された。

第 3 章で著者は、綿棒による牛肉表面のふき取り試料から得られる微生物代謝物あるいは蛍光物質の追跡調査に基づき、微生物増殖定量化のための新しい間接的手法を提案している。ここでは牛肉表面の内生蛍光物質量を予測するとともに、FF 信号に有意に影響する牛肉細胞片や脂肪組織のようなノイズをその表面から取り除くための方法も検討した。実験では 15°C の培養器内で保存された市販食肉試料（牛肉と豚肉）について、そのふき取りに用いた殺菌済の綿棒を緩衝溶液に浸し、ノイズ除去のために 0.45 μm と 0.22 μm のフィルターでろ過された緩衝液の FF データが求められた。PLSR モデルが展開され FF から生菌数（APC）が概算され、FF から食肉表面の APC を予測するための PLSR において、 R^2 と RMSECV はそれぞれ 0.88 および 0.51 log CFU/cm² であった。PLSR 検証モデルは、それが RMSEP で 0.52 CFU/cm² と僅少となること、牛肉と豚肉の微生物数の予測は異なる VIP を有すること等が示された。しかしながら内生蛍光物質のすべては高い VIP スコアを示し、微生物増殖が蛍光物質の代謝に深く相関すると考えられた。すなわち微生物増殖は細胞の複製のみならず栄養の消費と代謝物の排出に関与し、FF は代謝物変化を伴う微生物増殖を説明することが証明された。

第 4 章で著者は光ファイバーを使った FF による牛肉 APC の最適な予測手法を示している。ここで 15°C の培養器内に保存された試料（1×1 cm²）につき、12、24、36、48、60、72 時間後の FF データおよび APC が同時に求められた。PLS 回帰モデルは新しい FF と APC のデータセットにより検証され、システムの PLS 回帰検証モデルは R^2_{val} と RMSEP がそれぞれ 0.813 および 0.881 log CFU/cm² という高い予測精度を示した。VIP は 4 種類の蛍光物質（トリプトファン、NAD(P)H、ポルフィリン、フラバン）と相関するいくつかの波長域に由来するものであった。

第 5 章で著者は以上の研究の結論として、試料の簡単な準備と蛍光分光光度計チャンバー外での光ファイバーを用いた FF システムが、食品生産ラインでの迅速かつ非破壊で連続的な計測を可能にするモニタリング技術として実用性の高いことを示している。

審 査 の 要 旨

食品の微生物検査は、食の安全安心を確保するために必要不可欠なプロセスである。その公定法として微生物培地を用いたコロニー培養・カウント法が一般的に使用されているが、時間や労力等を要することが課題とされてきた。著者は、非破壊かつ迅速な物性計測を可能とする分光分析法の一つ、蛍光指紋法（Fluorescence Fingerprint、FF）に着目し、食肉中微生物の検出への適用を提案して、そのプロセス特性を解析した。

本論文においては、FF データと微生物の蛍光代謝産物との相関を PLSR により解析する手法が確立され、従来の液体試料を対象とする定量から実食肉試料の定量へと方法論を発展させるとともに、FF を原理とする食肉微生物計測のベンチスケールモデルを構築し、その実用化のための特性解析を行ったことが高く評価された。得られた知見は FF が従来法と比較して精度や効率に優れ、食品の分光分析技術の向上に寄与できることを示すものでもある。したがって本論文は高い学術的価値を有するのみならず、食品産業の発展にも資する優れた学位論文であると判断された。

平成 29 年 1 月 27 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。