

蛍光指紋によるチェダーチーズ熟成度
指標値の推定に関する研究

2019年1月

千葉 啓

蛍光指紋によるチェダーチーズ熟成度
指標値の推定に関する研究

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
国際地縁技術開発科学専攻
博士（農学）学位論文

千葉 啓

目次

第1章 緒論	1
第2章 既往の研究	5
2-1 プロセスチーズ用原料ナチュラルチーズの選定	5
2-2 ナチュラルチーズの熟成	6
2-3 ナチュラルチーズ熟成度指標値の評価、検査法	6
2-4 分光学的手法の乳業への応用	8
2-5 蛍光分光法の既往研究	9
2-6 蛍光指紋	9
2-7 総括	11
第3章 ノーマルタイプチェダーチーズ熟成度指標値の蛍光指紋による推定	13
3-1 序	13
3-2 材料および方法	13
3-3 結果および考察	15
3-3-1 化学分析結果	15
3-3-2 蛍光指紋測定結果	15
3-3-3 熟成度推定モデルの作成および寄与率の高い物質の推定	16
3-4 結論	25
第4章 フレーバータイプチェダーチーズ熟成度指標値の蛍光指紋による推定	26
4-1 序	26
4-2 材料および方法	26
4-3 結果および考察	28
4-3-1 化学分析結果	28
4-3-2 蛍光指紋測定結果	28

4-3-3	熟成度指標値推定モデルの作成および寄与率の高い物質の推定	28
4-4	結論	47
第 5 章	チェダーチーズの組織熟成度指標値の非接触の蛍光指紋測定による推定	48
5-1	序	48
5-2	材料および方法	49
5-3	結果および考察	51
5-3-1	化学分析結果	51
5-3-2	蛍光指紋測定結果および非接触測定の妥当性	51
5-3-3	ボディ値推定のための PLS 回帰モデルの作成	52
5-3-4	PLS 回帰モデルに寄与の高い物質の推定	53
5-4	結論	65
第 6 章	蛍光指紋によるチーズ組織官能評価指標値の推定 機構の考察	66
6-1	序	66
6-2	材料および方法	66
6-3	結果および考察	67
6-3-1	遊離アミノ酸含量とボディ値の相関	67
6-3-2	SEM による構造観察	67
6-3-3	物性測定値とボディ値の相関	68
6-3-4	蛍光指紋によるボディ値推定のメカニズムの考察	68
6-4	結論	76
第 7 章	総括	77
	引用文献	81
	謝辞	93

目次

Fig. 1-1 Schematic overview of the manufacturing process for pasteurized processed cheese.	4
Fig. 2-1 General overview of the biochemical pathways which operate in cheese during ripening.	12
Fig. 3-1 Transition of each maturity index in the maturation period (Days after production).	19
Fig. 3-2 Typical fluorescent fingerprint contour map of normal type cheddar cheese in range of normal intensities (0–7000 intensity (a.u.)).	20
Fig. 3-3 PLS regression models of predicted value against measured value.	22
Fig. 3-4 Contour maps of loadings of 1st latent variable in each PLS model.	23
Fig. 3-5 Fluorescence emission spectra color coded by maturation times at excitation wavelength of (a) 345 nm and (b) 290 nm.	24
Fig. 4-1 Transition of each maturity index in the maturation period (Days after production).	36
Fig. 4-2 Typical fluorescent fingerprint contour map of flavor type cheddar cheese in range of normal intensities (0–4500 intensity (a.u.)).	37
Fig. 4-3 Comparison between predicted value and measured value of total free amino acids.	39
Fig. 4-4 Contour maps of each score in the PLS model of total free amino acids: (a) Loading (1st), (b) VIP, and (c) SR.	40
Fig. 4-5 Comparison between predicted value and measured value of total free fatty acids.	41
Fig. 4-6 Comparison between predicted value and measured value of proteolysis index.	42
Fig. 4-7 Contour maps of each score in the PLS model of proteolysis index: (a) Loading (1st), (b) VIP, and (c) SR.	43
Fig. 4-8 Comparison between predicted value and measured value of maturation time.	44
Fig. 4-9 Contour maps of each score in the PLS model of maturation time: (a) Loading (1st), (b) VIP, and (c) SR.	45

Fig. 5–1 Structure of FF measurement with fiber optics system.	56
Fig. 5–2 Typical fluorescence fingerprint contour maps of body type cheddar cheese. (a) Non-contact measurement, (b) Contact measurement.	58
Fig. 5–3 Comparison between predicted value and measured value by FF measurement using optical fiber.	60
Fig. 5–4 Comparison between predicted value and evaluated value of body value.	62
Fig. 5–5 Contour maps of each score in the PLS model of body value: (a) VIP, (b) SR, and (c) Regression vector.	63
Fig. 5–6 Fluorescence emission spectra color coded by body value at excitation wavelength of (a) 340 nm, (b) 385 nm, and (c) 305 nm.	64
Fig. 6–1 Structural observation by SEM.	73
Fig. 6–2 Estimation mechanism by Maillard reaction products to body value prediction by fluorescent fingerprint.	75

表目次

Table 3–1 Chemical analysis results in each cheddar cheese sample.	18
Table 3–2 Cross-validation results to predict total free amino acids, proteolysis index, and maturation time with different preprocessing methods.	21
Table 4–1 Chemical analysis results in each cheddar cheese sample.	35
Table 4–2 Cross-validation results to predict total free amino acids, total free fatty acids, proteolysis index, and maturation time with different preprocessing methods.	38
Table 4–3 List of wavelength regions and corresponding substances which contribute to each prediction model.	46
Table 5–1 Physico-chemical compositions of the 10 Cheddar cheeses.	57
Table 5–2 Results of PLS regression for four pretreatment methods. (Non-contact FF measurement) (a) Free amino acids, (b) Proteolysis index.	59
Table 5–3 Results of PLS regression for four pretreatment methods to predict body value.	61
Table 6–1 Measurement result of free amino acid content and evaluation result of body value.	71
Table 6–2 Correlation coefficient between content of each free amino acid and body value.	72
Table 6–3 (a) Result of physical property measurement by texture analyzer, (b) Correlation coefficient between physical property value and body value.	74

第1章 緒論

世界の全ての畜種を含む生乳生産量の合計は 2018 年には 8 億 2900 万トンに達する見込みであり、これは前年比で 1670 万トン (2.1%) の増加にあたる。年々生乳生産量が増加している背景として、特にアジア地域での伸びが著しい。アジアの生乳生産量は前年比で 970 万トン (3%) の増加にあたる 3300 万トンが見込まれ、主産地のインド、中国、パキスタン、トルコがその増加をけん引している。その他地域においても EU や米国を筆頭とする主要生乳生産国やニュージーランドをはじめとする主要輸出国が着実にその生産量を増加させ、人口の増加と乳食文化の広がりが増加する乳製品消費を世界中に浸透させている (FAO, 2018)。

生乳は飲用乳、発酵乳 (ヨーグルト)、バター、粉乳、チーズなど、様々な形態に加工され消費されている。中でもチーズは発酵乳と同じく最も古い乳製品であり、その歴史は人類が哺乳動物を家畜化した紀元前 6000 年頃に遡ると言われる。チーズには大きく分けて 2 種類あり、ナチュラルチーズとプロセスチーズに分類できる。ナチュラルチーズは生乳を原料とし、凝乳酵素 (レンネット) や乳酸菌等の生成する酸による乳の凝固、およびその凝乳物からの乳清 (ホエイ) の除去により製造されるのが基本的な工程である。この基本的な工程に加え、乳の由来動物、凝乳酵素や乳酸菌の種類、製造工程条件、加塩方法や熟成条件などを組み合わせ、そのチーズに独特な特徴を生み出している。世界中では様々な品種のナチュラルチーズが製造されており、その種類は 1000 種以上あると言われている。

一方プロセスチーズはナチュラルチーズをメインの原料として製造され、その歴史はわずか 100 年ほどである。冷蔵保管設備や流通網の発達していない中、それまで産地周辺に限定されていたナチュラルチーズの消費をより遠くの地域の消費者へ広めるために、風味、品質を長く保持する試みがプロセスチーズの開発につながった。

商業的には、1911 年にスイスの Walter Gerber と Fritz Stettler によって、エメンタールチーズにクエン酸ナトリウムを添加して加熱することで均一な組織となり、プロセスチーズが得られることが見いだされた。また 1916 年に米国の James Lewis Kraft が独自に製造方法を開発した特許が発行された (Kapoor & Metzger, 2008; 現代チーズ学, 2008; 新説チーズ科学, 1989)。日本においては、プロセスチーズは乳及び乳製品の成分規格等に関する省令 (乳等省令, 2018) により、「ナチュラルチーズを粉碎し、加熱溶融し、乳

化したもの」として定義されている。

プロセスチーズには以下のような利点がある。1) 長い賞味期限を持つ。2) 複数のナチュラルチーズの特徴を併せ持ち、シーズニングの添加などにより、風味のバリエーションが多彩である。3) 風味がマイルドであり、ナチュラルチーズに馴染みのない人々でも美味しく食することができる。4) 形状やテクスチャー（弾性、硬さ、スプレッド性、スライス性）の調整が可能である。5) 加熱時の溶けやすさ、焦げやすさ、粘度といった面で調理に合わせやすい (Guinee, Caric, & Kalab, 2004; Kapoor & Metzger, 2008; Tamime, 2011)。

日本における本格的なチーズ消費は、第2次大戦後の生活様式の洋風化、昭和30年代の学校給食へのチーズの導入、さらに昭和40年代後半のスライスチーズ開発により、プロセスチーズを主としてその量を拡大してきた (現代チーズ学, 2008)。日本におけるチーズの消費量は、平成28年度においてナチュラルチーズ、プロセスチーズを合計して33.8万トンに達した (農林水産省, 平成29年度チーズの需給表)。このうち、ナチュラルチーズが20.8万トン、プロセスチーズが13.0万トンである。総消費量に占めるプロセスチーズの内訳は39%ほどあり、諸外国に比較しプロセスチーズの比率が多いのが、日本におけるチーズ消費の特徴である。したがって、日本におけるプロセスチーズは、ナチュラルチーズの代替としての役割が主となる諸外国と比較し、その製造方法や品質の面において独自の進化を遂げてきたといっても過言ではない。個包装スライス、ベビーや6P、スクエアのようなポーション、カルトン、プレカット、キャンディ、スプレッドなどバラエティも多く、各社独自の配合でその特徴を出している。

プロセスチーズの基本的な製造工程は、(A) 原料のナチュラルチーズを粉砕し、水および溶融塩と混合する工程、(B) 間接、または蒸気を吹き込み直接加熱しながら、混練、攪拌、または剪断し乳化（溶融）する工程、(C) 溶融したチーズを任意の形に成型、冷却する工程からなる (Fig. 1-1)。目的とするプロセスチーズ製品を得るためには、原料とするナチュラルチーズの種類や熟成度合い、添加物の種類や量、加熱溶融温度、攪拌の速度や時間、冷却の速度など、様々な条件の調整が必要である。中でもナチュラルチーズの熟成度合いの調整は、最終製品のプロセスチーズの品質特性を決定する重要な項目である。ナチュラルチーズの熟成度合いの把握については、機器測定や化学分析といった時間と手間を要する手法や、官能評価といった評価者の育成や熟練を要する方法が各社で採用されている。上述のように、チーズ消費量が増加し、それに伴い取

り扱う原料チーズの量が増加していく昨今の傾向、および近年の労働人口の減少に伴う熟練者の不足を鑑みると、より迅速で正確な熟成度合いを把握する方法の開発が期待されている。

これらの現状を踏まえ本研究では、プロセスチーズ原料用ナチュラルチーズの熟成度指標値を迅速に把握する手法として、蛍光指紋と多変量解析を用いた新規評価手法の可能性に着目し、その応用について検討すること目的とした。そして、迅速法としての蛍光指紋の応用性について、下記の（１）～（３）により検討を試みた。

- （１）ノーマルタイプ、フレーバータイプチェダーチーズの化学的熟成度指標値の蛍光指紋による推定（第３章、第４章）
- （２）チェダーチーズの組織官能評価指標値（物理的熟成度指標値）の非接触蛍光指紋測定による推定（第５章）
- （３）蛍光指紋で物理的熟成度指標値を推定するメカニズムの解明（第６章）

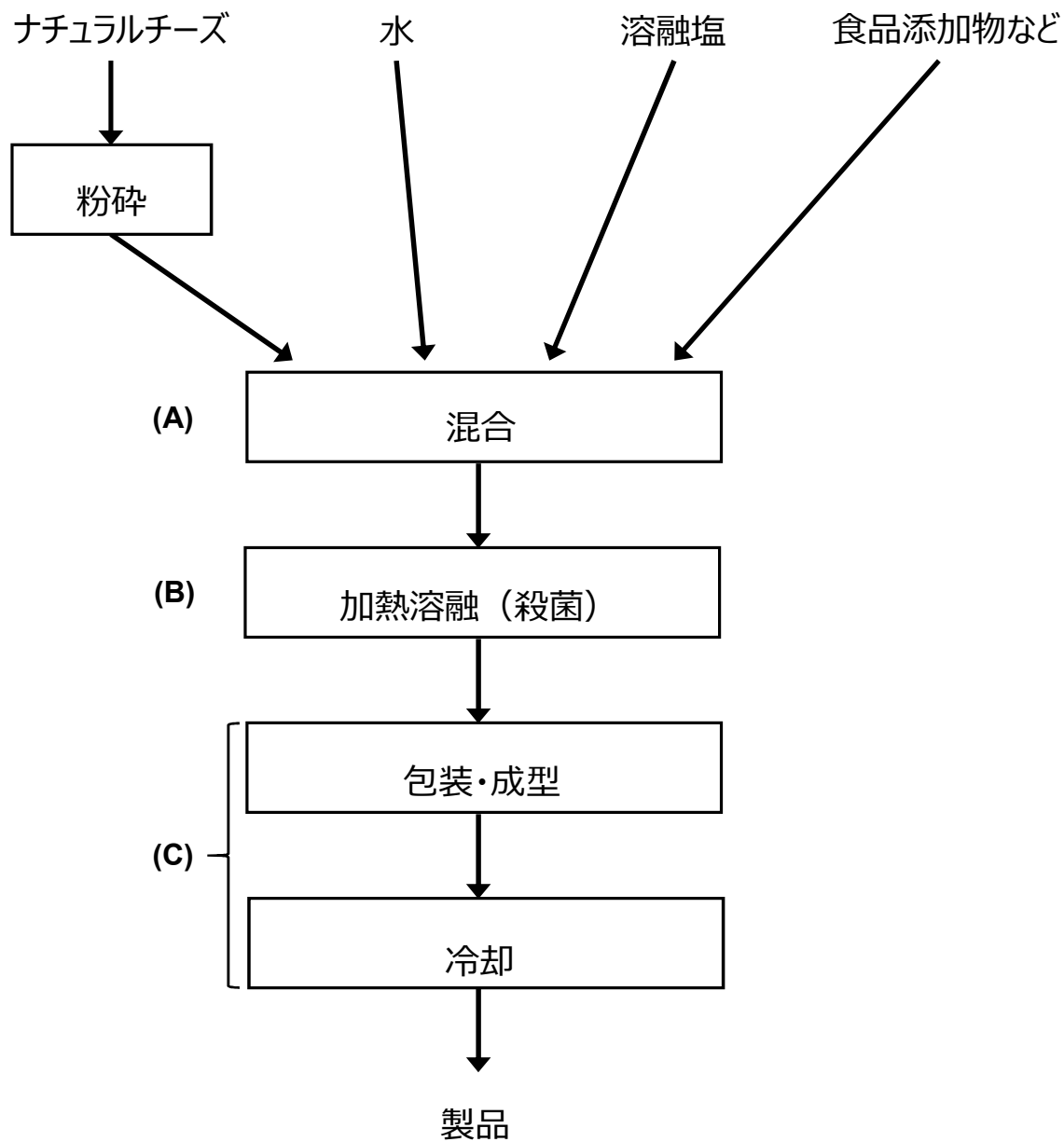


Fig. 1-1 Schematic overview of the manufacturing process for pasteurized processed cheese.

(A), (B), (C) in the figure correspond to the explanation in the text

第2章 既往の研究

本章では、本研究の背景となる技術や研究結果について述べる。初めにプロセスチーズ原料用ナチュラルチーズの分類を示し、それらについて、現在利用されている評価方法を概説する。また、分光学的手法の乳業への応用の現状や、これまで食品分野において開発された蛍光指紋による迅速評価法に関する先行研究をレビューし、本研究の意義および解決すべき課題を明確にする。

2-1 プロセスチーズ用原料ナチュラルチーズの選定

緒論にも述べたように、プロセスチーズ原料用のナチュラルチーズの選定においては、その熟成度合いが製品の物性に大きな影響を与える。すなわち、熟成が進んでおらず未分解のカゼインタンパク質（インタクトカゼイン）が多く残存している、いわゆるヤングチーズを多く使用すれば硬い物性の製品ができ、熟成が進みインタクトカゼインの減少したマチュアードチーズを多く使用した場合には、軟らかい物性の製品ができる (Piska & Štětina, 2004; Purna, Pollard, & Metzger, 2006)。このためプロセスチーズメーカーは、各原料ナチュラルチーズの熟成度合いを把握すると共に、熟成度合いの異なる複数のナチュラルチーズを組み合わせ、ターゲットとする製品物性や風味になるように製造している。

一般的に原料ナチュラルチーズは、その役割と特徴から以下の3つに大きく分類される。1) 熟成が進んでおらず品種特有の風味も少なく、組織の分解も進んでいないチーズ、2) 熟成が少々進みマイルドな風味と中程度に分解された組織を持つチーズ、3) 熟成が良く進んでおり品種特有のフレーバーが強く、組織の分解も進んだチーズ、の3つである。これら分類や名称については、プロセスチーズを製造するメーカーや研究者により様々に表現されるが、一例を示すと 1) の熟成が進んでいないチーズは”young cheese”, “young green cheese”, “current cheese”、2) の中程度に熟成の進んだチーズは”medium cheese”, “medium-ripe cheese”, ”mild cheese”, “short held cheese”、3) の熟成の進んだチーズは”ripe(ned) cheese”, “storage cheese”, “matur(ed) cheese”と呼ばれている (Zehren & Nusbaum, 1992; Wolfgang, Henning, Karl, & Uhlmann, 2002)。そこで本研究では、1) を「ボディタイプ」、2) を「ノーマルタイプ」、3) を「フレーバータイプ」と名称を統一して使

用することとする。

2-2 ナチュラルチーズの熟成

ナチュラルチーズの熟成は、その構成物質の分解または代謝という生化学的変化に伴い、そのチーズに独特な風味と組織を形成する工程である。すなわち、カゼインタンパク質はチーズ中の凝乳酵素、乳またはスターター乳酸菌、非スターター微生物由来のプロテアーゼやペプチダーゼにより、ペプチドやアミノ酸に分解され、その一部はアンモニア、アミン、メタンチオール、メチルメルカプタン、硫化水素などの含硫化合物を生成する。脂肪はチーズ中のリパーゼにより脂肪酸やグリセロールに分解され、その一部はメチルケトン、アルデヒド、アルコール、エステル等を生成する。また乳糖はスターター乳酸菌やノンスターターの乳酸菌により乳酸に代謝されてチーズの pH 低下が起こり、その後の熟成工程では、乳酸菌種に応じてその一部が酢酸やエタノール、プロピオン酸等へと変換される。このような代謝や分解により、組織は軟らかくもろくなり、生成した物質とその組み合わせによりチーズの品種特有な風味と香りを付与している (Fig. 2-1) (McSweeney, 2004; 現代チーズ学, 2008)。このようにナチュラルチーズの熟成時には複数の反応が同時に起こっているのが特徴である。

2-3 ナチュラルチーズ熟成度指標値の評価、検査法

これまで行われてきたナチュラルチーズの熟成度合いを把握する手法は、チーズの熟成が進行する際に分解もしくは生成する物質や物性の変化を捉えることにより、熟成の度合いを把握するものである (Guinee & Kilcawley, 2004)。いくつかの方法があるが、代表的な例として、化学分析による指標物質の定量、物性測定と官能評価を挙げることができる。

指標物質の定量の例としては、インタクトカゼイン含量、タンパク質分解度（水溶性窒素含量／全窒素含量）、遊離アミノ酸含量、遊離脂肪酸含量の測定、電気泳動によるタンパク質の分離および定量など、主な構成成分であるタンパク質や脂肪のうち、熟成に伴い分解する物質、もしくは分解により生成する物質を定量することにより、熟成の度合いを把握するものである。また物性変化の把握には、レオメーターやテクスチャー

アナライザーを使用した物性 (Elasticity, Springiness, Fracturability, Brittleness, Longness, Crumbliness, Firmness, Adhesiveness 等) の測定 (O'Callaghan & Guinee, 2004) や、動的粘弾性の測定が利用されている。これら指標物質の定量や物性測定による熟成度合いの把握には、数値として測定結果が得られ、それぞれの結果が比較可能であるという利点がある一方で、結果を得るまでの工程が複雑であり数時間単位で時間を要したり、測定や分析に技術を要したりするなどの難点がある。

一方の官能評価は広くチーズの品質を把握するための手法であるが、熟成度合いの評価にも使用される。各国、各社により得点の項目尺度は異なるが、主にフレーバー／アロマ、ボディ／テクスチャー、色調／外観の項目について、訓練された評価者により加点または減点され、評価するものである (Muir, 2010; 新説チーズ科学, 1989)。チーズ生産国で各国により特有の評価システムが設定されている。例えばオーストラリアは欠点指向 (defect-oriented) であり、フレーバー50点満点、ボディ／テクスチャー30点満点、色調／外観20点満点の合計100点制で、93点以下になった場合には、欠点とその強度について記載することが決められている。一方ニュージーランドは加点指向 (attribute-oriented) の方式である。個々のチーズの特徴に合わせた評価項目を0-9点でスコアリングし、評価者 (最低3名) の評価の平均値が消費者調査より得られた官能特徴と合致しているか比較するものである。こちらは消費者の認識とより近い判断ができるように工夫されたシステムである (Muir, 2010)。官能評価も機器測定と同じく、チーズの熟成に伴う物性や指標物質の変化を人の五感により評価し、熟成度合いを把握するものである。官能評価は、上述の機器による指標物質の定量や物性測定と比較すると結果を得るまでの時間は短いが、評価者の育成や評価者間の評価尺度の統一など、日々の教育、訓練が欠かせない。そのため、昨今の熟練した人材の不足、今後の継続性を見据えると、従来法に代わり迅速かつ簡易に熟成度合いを把握できる手法の開発が必要である。

なお、食品の官能評価には「ボディ、ボディ感」といった評価用語が度々用いられるが、本研究にて取り上げた「ボディ値」は、チーズの組織を官能評価する物理的熟成度指標値を指す。ボディ値は訓練された評価者 (グレーダー) がチーズを手指ですりつぶした時の感覚で物性的な熟成度合いを表す指標値である。

2-4 分光学的手法の乳業への応用

分光学的手法による食品成分や物性の推定には、中赤外光 (MIR)、近赤外光 (NIR)、蛍光、ラマン光などを利用した方法があり、迅速な測定法として利用されている (Nawrocka & Lamorska, 2013)。中でも NIR と蛍光の分光法はサンプルの前処理が不要であり、産業的な利用において高い潜在性を持っている。

MIR による乳成分の迅速測定について、既に 1960 年代には日本国内に紹介されており (慶田, 1966)、1980 年代には NIR によるホモジナイズした生乳の脂肪、タンパク質、乳糖、乳固形分の測定について検討した報告がある (佐藤ら 1985)。更には酪農マネジメントを目的として、搾乳時のノンホモジナイズの生乳を対象に、NIR での迅速な成分測定について検討した報告もある (Tsenkova et al. 2000; Tsenkova et al., 1999)。また国内に限定せず研究報告を確認すると、基本成分のみでなく、生乳中の好気性細菌数の測定 (Saranwong & Kawano, 2008)、生乳および粉乳での混入異物および汚染物質の検出、生乳の脂肪球の数とサイズの推定、カゼイン画分および遺伝子型の違いの測定、乳脂肪の脂肪酸組成の分類、FT-NIR を使用した乳酸発酵のモニタリング、牛の乳房炎の診断、粉乳製造ラインにおけるプロセスと製品品質のモニタリングなど、様々な応用について検討した報告がなされている (Cattaneo & Holroyd, 2013)。

こうした研究の蓄積により、NIR やフーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) を利用した迅速測定機器はすでに製品化されており、乳業において導入されている。一例をデンマーク FOSS 社の製品にて挙げると、生乳の成分測定 (脂肪、固形分、タンパク質、乳糖) に MilkoScan™ (FT-IR)、固形物製品 (チーズ、ホエイパウダー、バター、ヨーグルト) の成分測定 (脂肪分、タンパク質、水分、塩分、無脂固形分、pH) に FoodScan™ Dairy Analyzer (NIR)、DairyScan™ (NIR)、製造工程中の生乳の成分モニタリングに MilkoStream™ (FT-IR)、中間製品および製品の成分モニタリングに ProFoss™ (NIR) がラインナップされ、乳原料から製品、また製造工程中の成分のモニタリングまで多岐にわたり展開されていることがわかる (FOSS 社ホームページ)。これらの分析機器は、FOSS 社に限らず、Büchi 社、Delta INSTRUMENTS 社 (現 Perkin Elmer 社) 等の世界に展開する企業や、各国の分析機器メーカーにて取り扱われており、世界の乳業に迅速測定法として浸透している。NIR は ISO 21543 / IDF 201 として (ISO / IDF, 2006)、また MIR は ISO 9622 / IDF 141 として (ISO / IDF, 2013)、国際規格に定められ認知されている。しかしながら、NIR や FT-IR

を使用した測定機器は、迅速法として単一成分の測定に用いられることが多く、ナチュラルチーズの熟成のように、様々な反応が同時に起こる過程を捉えることには、ほとんど使用されていないのが実情である。そのため、これらに代わる新たな迅速測定法が求められている。

2-5 蛍光分光法の既往研究

蛍光分光法は、近赤外分光法のような吸収スペクトルではなく、発光スペクトルを検出するため、NIR に比べ感度が高いという特徴がある (Karoui, Mazerolles, & Dufour, 2003; A. A. Kulmyrzaev, Karoui, De Baerdemaeker, & Dufour, 2007)。蛍光物質はその周囲環境 (温度、イオン濃度、pH、溶液の極性など) に対し敏感であり、さらに蛍光分光法による測定は比較的迅速である (Dufour, 2011)。乳製品を含む食品を対象とした測定も行われており、数多くの報告例がある (Andersen & Mortensen, 2008; Christensen, Nørgaard, Bro, & Engelsen, 2006; Karoui & Blecker, 2011)。乳製品のうち特にチーズに限ると、これまで蛍光分光法による推定の対象とされてきた指標は、化学分析値や製造条件、生産地域や製造時期を推定したものが多かった (Andersen & Mortensen, 2008; Karoui & Blecker, 2011)。チーズの組織、物性に関して推定を行ったものはいくつかあるが (Garimella Purna, Prow, & Metzger, 2005; Karoui & Dufour, 2006; Karoui et al., 2003; A. Kulmyrzaev et al., 2005; Lebecque, Laguet, Devaux, & Dufour, 2001; Ozbekova & Kulmyrzaev, 2017)、それらの報告はトリプトファンやビタミン A など 1 つまたは 2 つの物質に特有な励起波長を使用した際の蛍光スペクトルのピーク値から推定を行ったものが多く、限られた情報量の中での推定しか行われていない。

2-6 蛍光指紋

近年の情報処理技術の発展により、蛍光分光法による測定は 1 つまたは 2 つの励起波長とその蛍光スペクトルを測定していた方法から、励起-蛍光マトリックス (Excitation-Emission Matrix: EEM) または蛍光指紋 (Fluorescence Fingerprint: FF) として、連続した波長の励起光で得られる蛍光スペクトルを三次元の図として迅速に取得することが可能になった。蛍光指紋は連続した波長の励起光を使用し、それぞれの励起波長

に対する蛍光スペクトルを取得するため、従来の蛍光分光測定に比べ、格段に情報量の多い測定法として利用することができる (Airado-Rodríguez, Galeano-Díaz, Durán-Merás, & Wold, 2009; Sádecká & Tóthová, 2007)。加えて多変量解析手法を用いることで、蛍光スペクトルのピークの大きさだけでなく、微小な凹凸、ショルダーや、さらに微小の蛍光を含むすべての領域を対象とし、必要な情報のみを抽出したモデルを構築することができる(杉山 2014; 杉山 & 蔦, 2013; 蔦 & 杉山, 2015)。そのため、蛍光指紋は従来の単波長の蛍光分光法による推定と比較し、高精度に対象を推定できる可能性を持っている。蛍光指紋と多変量解析を利用した報告例として、マンゴーやサトイモといった農産物の産地判別 (中村ら 2012; 中村ら 2013)、そば乾麺におけるそば粉混合割合の推定 (Shibata et al., 2011; 杉山ら 2010)、小麦におけるカビ毒 (デオキシニバレノール、ニバレノール、ゼアラレノン) の定量推定 (Fujita, Tsuta, Kokawa, & Sugiyama, 2010; 藤田ら 2012; 藤田ら 2008; 藤田ら 2011)、ナツメグにおけるカビ毒 (アフラトキシン) の定量推定(Fujita et al., 2013)、食肉表面における生菌数の定量推定 (Oto et al., 2013; Shirai, Oshita, Makino, Sugiyama, & Yoshimura, 2014; Yoshimura et al., 2014; 大下 & 白井, 2014) があり、食品の品質や安全性の確認において多岐に渡り迅速測定法としての有効性が示されてきている。また近年では蛍光指紋イメージング手法により、パン生地、パイ生地におけるミキシング中のデンプンとグルテンの分布を可視化すること (Kokawa et al., 2013a, 2013b; Kokawa, Yokoya, et al., 2015) や、食肉表面の生菌数分布を可視化すること (Nishino et al., 2013) が可能となり、従来の蛍光指紋の対象であった定量、判別の迅速法としての利用だけでなく、食品製造工程や製品品質のモニタリングへも応用が進んでいる。

乳業分野において、蛍光分光法や蛍光指紋を利用して予測値を導き出す機器があり、いくつかの分析例とその推定精度について報告されている (Lacotte et al., 2015; Liu, Sajith Babu, Coutouly, Allouche, & Amamcharla, 2016)。また乳製品を含む食品に関する三次元の蛍光スペクトル測定の報告が数例あり (Sádecká & Tóthová, 2007)、チーズでの報告例もある (Andersen & Mortensen, 2008; Boubellouta & Dufour, 2008; Christensen, Povlsen, & Sørensen, 2003)。それらの報告は、トリプトファンやビタミン A など限定した物質の蛍光強度からの対象物質の推定や判別を行っており、蛍光指紋のように網羅的解析を行うまでには至っていないが、蛍光分光法、蛍光指紋の利用可能性の高さを示すものである。これまでの研究例からも、蛍光指紋のように感度が高く、網羅的解析を

可能とする手法は、NIR や MIR では実現できていないチーズの熟成状態のモニタリングといった新たな分野への応用が期待される。その実現のためには、本研究により更に知見を積み上げる必要がある。

2-7 総括

上記を踏まえ、プロセスチーズ原料用ナチュラルチーズの熟成度指標値を把握するための迅速法として蛍光指紋を応用し、実用化に近づけるためには以下の課題の解明が必須である。

- 1) タイプの異なるチェダーチーズにおいて、蛍光指紋による化学分析による熟成度指標値の推定が可能であるか評価し、適用可能範囲を確認する。
- 2) より実用性を高めるため、非接触の蛍光指紋測定により、測定するサンプルの前処理がより簡易にできるよう、光ファイバプローブを用いた蛍光指紋測定の実用性について評価する。
- 3) 蛍光指紋の測定により、官能評価によるチーズ組織の物性評価指標値（物理的熟成度指標値）が評価可能であるか評価する。

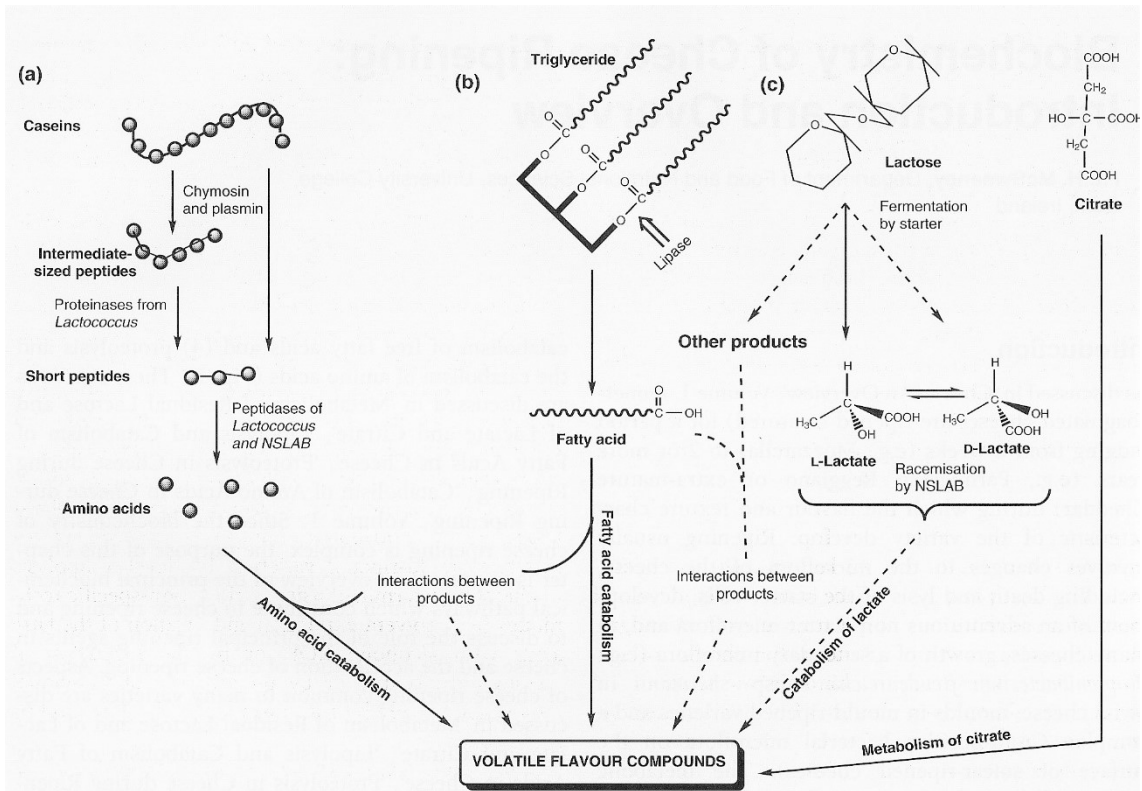


Fig. 2-1 General overview of the biochemical pathways which operate in cheese during ripening (McSweeney, 2004)

第 3 章 ノーマルタイプチェダーチーズ熟成度指標値の蛍光指紋による推定

3-1 序

緒論で述べたように、蛍光分光法を用いたチーズの産地判別や熟成度合いの推定に関しては、トリプトファンやビタミン A といった特定の物質に限定した蛍光強度の測定により研究されたものが多い。しかしながらナチュラルチーズの熟成中には同時に様々な反応が起こっており (McSweeney, 2004)、上述のように限られた物質のみを対象としても、その熟成状態を把握するには、推定精度に限度があると考えられる。蛍光指紋のように対象物質を限定しない網羅的な解析を行うことにより、より精度の高い熟成度指標値の推定モデルを構築することが期待される。

本章ではノーマルタイプのチェダーチーズを用い、蛍光指紋の測定により従来のチーズ熟成度指標値を推定することを目的とし、その基礎的な検討を行った。

3-2 材料および方法

【材料】

国産のノーマルタイプチェダーチーズを使用した。製造ロットは 5 ロットを使用し、ガスバリア性を有するフィルムにてバキュームシールし、保管は 5°C で行った。製造後 16 日から 329 日の期間で 16 点の測定を行った。測定のタイミングで同じチーズブロックから蛍光指紋測定用と化学分析用に試料を分割し、それぞれの測定に使用した。化学分析用のチーズブロックは、熟成が進行しないように蛍光指紋測定日より 2 日以内に冷凍保存 (-18°C) を行い、化学分析に供した。

【化学分析】

タンパク質分解度 (全窒素含量における水溶性窒素含量の割合) の測定は、チーズ中の全窒素含量における pH 4.6 水溶液に可溶性窒素含量の割合を示す測定法であり、Kuchroo & Fox (1982) の方法に従った。それぞれのサンプルで 2 検体測定を行い、その平均値を採用した。本方法により、チーズの熟成に伴うカゼインタンパク質の経時的な

分解の進行度合いを確認した。遊離アミノ酸含量の測定はニンヒドリンポストカラム誘導体化法を用い、高速アミノ酸分析計 (L-8900; 株式会社 日立ハイテクノロジーズ) にて測定した。

pH は pH メータ (D-54; 株式会社堀場製作所) を用いて、粉碎したチーズサンプルに電極を突き刺して測定した。

【蛍光指紋の測定】

蛍光指紋の測定に使用するチーズブロックは、まず 1 cm 厚の板状にカットし、チーズ温度が 20°C になるように 1~2 時間程度、空調管理された室内にて温度調整を行った。その後、直径 0.9 cm の円柱状にくり抜き、約 1.5 mm 厚のディスク状になるようにマイクロトームの刃を用いてスライスした。このチーズサンプルを蛍光分光光度計 (F7000; Hitachi High-Technologies corporation, Tokyo, Japan) の固形・粉体用セルに石英ガラスとの間に空気が入らないように封入し、固形試料ホルダにセットして測定に供した。蛍光指紋の測定は励起波長、蛍光波長共に 200–700 nm、波長のインターバルは 5 nm で行った。励起光、蛍光のモノクロメーターのスリットは 5 nm、ホトマル電圧は 460 V、スキャンスピードは 60000 nm / min. とした。1 種のサンプルにつき、サンプルチーズを入れ替えながら 8 回の測定を行った。

【熟成度指標値推定の PLS 回帰モデル作成】

蛍光指紋の測定値から熟成度指標値を推定するために、PLS 回帰モデルを作成した。多変量解析には、MATLAB software (R2011a, MathWorks Inc., USA) と PLS Toolbox (version 7.9.2, Eigenvector Inc., USA) を使用した。蛍光指紋のデータは、(Yoshimura et al. 2014) の方法に従って前処理を行った。最初に、蛍光は励起波長よりも長い波長で起こる発光現象であるため、蛍光波長より短い励起波長のデータを取り除いた。次に、励起波長と同じもしくは、2 倍、3 倍の蛍光波長である 1 次、2 次、3 次散乱光を取り除いた (Fujita et al. 2010)。最後にノイズの多い励起波長 230 nm 以下、500 nm 以上の波長帯のカットを行った。これらの処理により残ったデータは、3017 条件の励起波長と蛍光波長の組み合わせからなる。

測定したサンプル数 (16 サンプル) はデータをトレーニングセットとテストセットに分けるには少ない為、クロスバリデーションを用いてモデルの作成を行った。得られ

た 16 サンプル分のデータを用いて、クロスバリデーションを行い、最適な前処理と潜在変数を決定した。1 サンプルにつき 8 回の繰り返し測定を行ったデータは、ひとまとまりとなるように、トレーニングセット、テストセットに分けた。前処理は mean center, normalize + mean center, autoscale, の 3 処理で比較した。Mean center は特定のデータからその平均を引いたものを新たなデータとすることである。また normalize は、各スペクトルの下の面積が 1 に等しくなるようにデータをスケールし、autoscale は各波長を平均 0 および分散 1 にスケールする前処理である。潜在変数は scree plot 中の”knee”として知られる下降部分を見つける PLS Toolbox のアルゴリズムを使用して決定した (Henry et al. 1999)。次にその潜在変数と前処理を用いて PLS 回帰モデル (予測モデル) を作成し、推定の精度を確認した。更にすべてのサンプルをトレーニングセットデータとしてモデルに当てはめて PLS 回帰モデルの予測誤差 (root mean square error of calibration: RMSEC) を確認した。予測モデルの正確性に関しては、クロスバリデーションモデルの決定係数 (coefficient of determination of cross-validation: R^2CV) と予測誤差 (root mean square error of cross-validation: RMSECV) で評価した。

3-3 結果および考察

3-3-1 化学分析結果

各サンプルにおける pH、タンパク質分解度、遊離アミノ酸含量の分析結果を Table 3-1 に示した。また、熟成期間における遊離アミノ酸含量、タンパク質分解度の推移を Fig. 3-1 に示した。遊離アミノ酸含量は 329 日の最終サンプルまで直線的な増加を示したのに対し、タンパク質分解度は製造後 200 日頃まで直線的に増加し、その後増加が緩やかとなる傾向であった。

3-3-2 蛍光指紋測定結果

ノーマルタイプチェダーチーズの標準的な蛍光指紋図を Fig.3-2 に示した。励起波長 290–305 nm、蛍光波長 320–350 nm の範囲に蛍光のピークが観察された。このピークはトリプトファンを含む芳香族アミノ酸のピークと判断された (Andersen & Mortensen, 2008; Andersen et al. 2005; Mazerolles et al., 2001)。その他、励起波長 320 nm、蛍光波長 400 nm にも強度の高い波長域があり、こちらはビタミン A の波長と考えられた。これ

まで乳 (Boubellouta & Dufour, 2008; Dufour & Riaublanc, 1997)、ソフトチーズ (Herbert et al., 2000)、セミハードチーズ (Karoui, Dufour, & De Baerdemaeker, 2006) やプロセスチーズ (Christensen, Povlsen, & Sørensen, 2003) の蛍光測定で報告されている。

3-3-3 熟成度指標値推定モデルの作成およびモデルへ寄与する物質の探索

Table 3-2 に各熟成度指標値 (タンパク質分解度、遊離アミノ酸含量、熟成期間) における、前処理とその精度について示した。R²CV が高く、RMSECV の小さい前処理が、最も正確であるとされる。タンパク質分解度では autoscale の前処理が、遊離アミノ酸含量と熟成期間では normalize + mean center の前処理がそれに該当した。これらの前処理を用いて各指標値の推定モデルを作成した結果を Fig. 3-3 に示す。

遊離アミノ酸含量の推定モデルは潜在変数 5 の時に最も精度が高く、その R²CV は 0.90、RMSECV は 116.2 mg/100g であった (Fig. 3-3 (a))。すべてのデータをモデルに当てはめた際の予測誤差 RMSEC は 80.0 mg/100g であり、遊離アミノ酸含量の最大値における RMSECV の割合は 8.8% であった。タンパク質分解度の推定モデルは潜在変数 7 の時に最も精度が高く、その R²CV は 0.79、RMSECV は 3.49% であった (Fig. 3-3 (b))。またすべてのデータをモデルに当てはめた際の予測誤差 RMSEC は 1.67% であり、タンパク質分解度の最大値における RMSECV の割合は 11.8% であった。熟成期間の推定モデルは潜在変数 5 の時に最も精度が高く、その R²CV は 0.93、RMSECV は 27.0 d であった (Fig. 3-3 (c))。すべてのデータをモデルに当てはめた際の予測誤差 RMSEC は 18.9 d であり、タンパク質分解度の最大値における RMSECV の割合は 8.2% であった。いずれの熟成度指標値においても、許容範囲内の誤差で推定可能であることが明らかとなった。サンプルの分布が前半に偏り不均一な傾向が見られたことや、サンプル点数自体が少なかったことを改善することにより、モデルの精度はさらに向上させることが可能と考えられた。

Fig. 3-4 に、PLS 回帰モデルに寄与する波長範囲の確認を行うために、第 1 潜在変数のローディングスコアを等高線図に表示した。遊離アミノ酸含量 (Fig. 3-4 (a)) と熟成期間 (Fig. 3-4 (b)) の傾向が似ており、励起波長 345 nm、蛍光波長 420 nm の領域が相関の高いことが確認された。一方でトリプトファンを中心とした芳香族アミノ酸の波長域として知られる励起波長 290 nm、蛍光波長 350 nm の波長域 (Andersen & Mortensen, 2008) は相関が低かった。

Fig. 3-5 (a) には励起波長 345 nm における各チーズサンプルの蛍光スペクトルを示した。熟成期間が長くなるにつれて、蛍光波長 420 nm 付近のピークが高くなる傾向が確認され、励起波長 345 nm、蛍光波長 420 nm における蛍光強度と熟成期間の相関係数は 0.81 であった。この波長域に対応する物質として、脂質酸化物 (Dillard & Tappel, 1971)、メイラード反応生成物 (Birlouez-Aragon et al., 1998; Birlouez-Aragon, Sabat, & Gouti, 2002; Francisco J. Morales, Romero, & Jiménez-Pérez, 1996; F. J. Morales & van Boekel, 1998; Schamberger & Labuza, 2006) や酸化生成物とアミノ基によるシッフ塩基 (Kikugawa & Beppu, 1987) といった複数の物質の報告がある。特にメイラード反応生成物については、チーズの熟成中に進行するという報告 (Corzo, Villamiel, Arias, Jiménez-Pérez, & Morales, 2000) があり、深い関与が示唆される。また Fig. 3-5 (a) では、複数のピークが重なっているように見えることから、複数の物質が関与していることも考えられた。

一方、Fig. 3-5 (b) には励起波長 290 nm の各チーズサンプルの蛍光スペクトルを示した。蛍光波長 345 nm に確認されるピークは芳香族アミノ酸のピークであると判断した。蛍光波長 345 nm における蛍光強度と熟成期間の相関係数は-0.22 であった。1 つまたは 2 つの励起波長を用いた従来の蛍光測定による報告では、この波長域は頻繁に利用されてきた (Herbert et al., 2000; Mazerolles et al., 2001)。この報告によれば、熟成によるタンパク質分解に伴い、三次、および四次構造が変化し、トリプトファンを含む芳香族アミノ酸の周囲が親水性の環境に近づくことで蛍光強度のピーク波長がシフトすることによる変化を捉えていると説明している。しかし本研究ではそのようなピークのシフトは確認されなかった。これは使用したサンプルの季節や熟成期間の差により、この波長域における蛍光強度がばらついたことが考えられる。一方で蛍光指紋による網羅的な解析を行った場合には、トリプトファンの蛍光ピークのシフトよりも、その他の波長域の物質の蛍光の変化が、より推定モデルの構築に寄与していることが示唆された。

Table3–1 Chemical analysis results in each cheddar cheese sample.

Sample No.	Maturing period (days)	pH	Proteolysis index (%)	Total free amino acids (mg / 100g)
1	329	5.44	26.46	1217.1
2	328	5.31	28.25	1288.1
3	327	5.38	29.44	1325.2
4	29	5.20	10.16	203.1
5	47	5.08	16.15	217.0
6	64	5.15	16.10	255.8
7	16	5.18	5.13	126.9
8	22	5.22	10.89	141.8
9	91	5.24	20.62	317.1
10	31	5.16	7.12	180.0
11	44	5.25	11.93	222.9
12	65	5.27	13.45	319.9
13	125	5.20	24.68	399.0
14	140	5.29	25.83	552.2
15	200	5.24	29.61	645.9
16	203	5.31	29.11	793.3

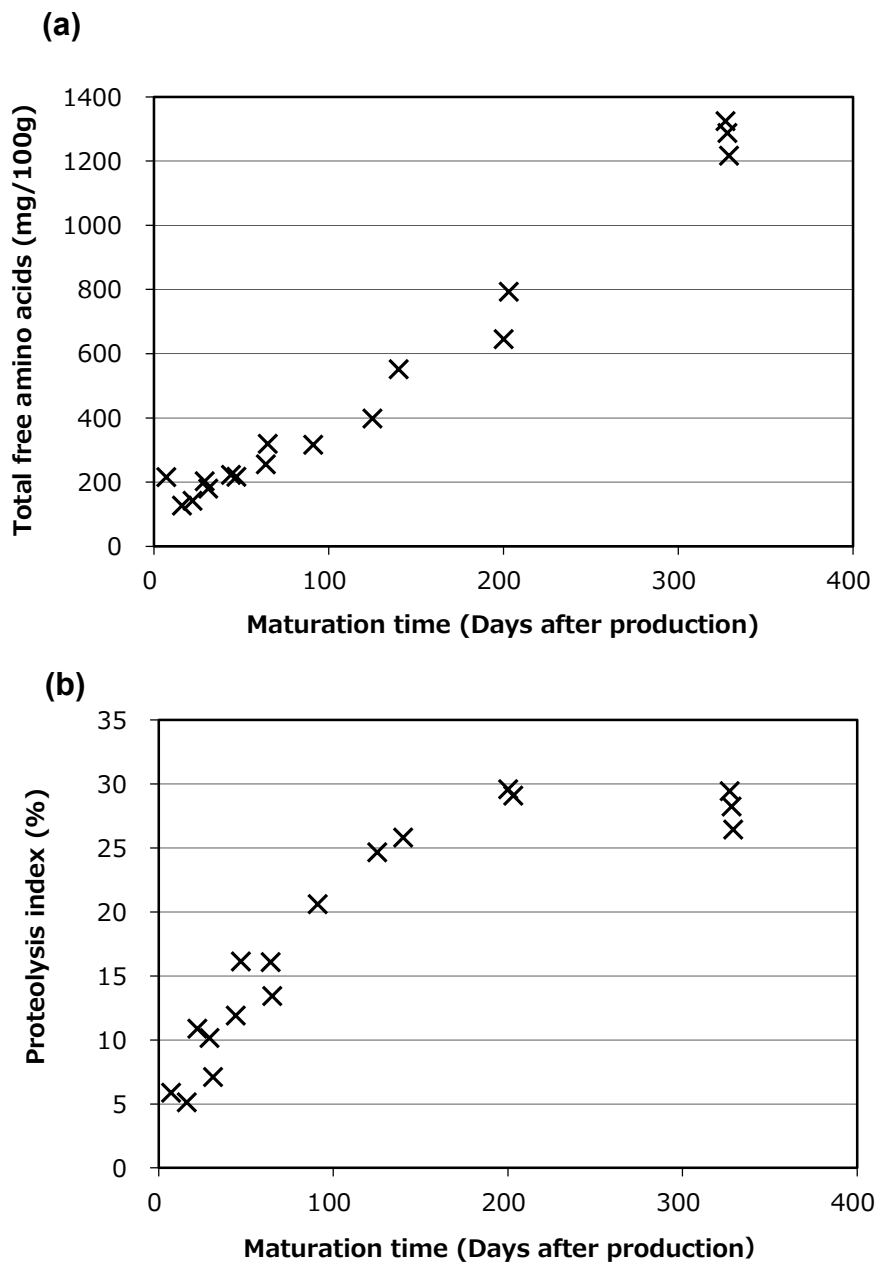


Fig. 3-1 Transition of each maturity index in the maturation period (Days after production).

(a) Total free amino acids, (b) Proteolysis index

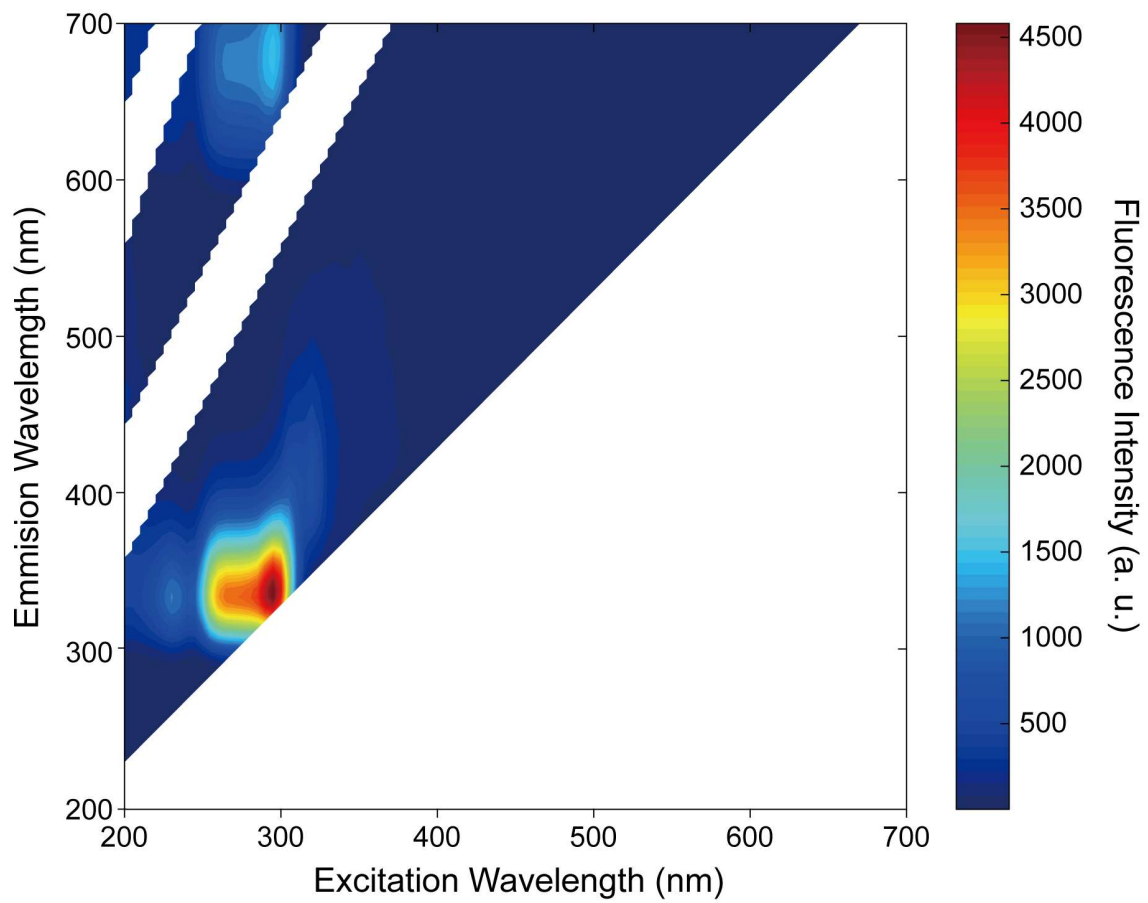


Fig. 3-2 Typical fluorescent fingerprint contour map of normal type cheddar cheese in range of normal intensities (0–7000 intensity (a.u.)).

Table 3–2 Cross-validation results to predict total free amino acids, proteolysis index, and maturation time with different preprocessing methods. Abbreviations are; LVs: latent variables, RMSEC: root mean square error of calibration, RMSECV: root mean square error of cross-validation, R²CV: coefficient of determination of cross-validation.

Free amino acids

	LVs	RMSEC (mg/100g)	RMSECV (mg/100g)	R ² CV
Mean-center	6	85.8	124.7	0.88
Normalize + mean-center	5	80.0	116.2	0.90
Autoscale	3	129.9	162.6	0.80

Proteolysis index

	LVs	RMSEC (%)	RMSECV (%)	R ² CV
Mean-center	5	3.03	4.25	0.69
Normalize + mean-center	7	1.67	3.58	0.78
Autoscale	7	1.67	3.49	0.79

Maturation time

	LVs	RMSEC (d)	RMSECV (d)	R ² CV
Mean-center	5	22.8	33.5	0.89
Normalize + mean-center	5	18.9	27.0	0.93
Autoscale	4	24.8	36.0	0.87

Fig. 3-3 PLS regression models of predicted value against measured value for (a) total free amino acids, (b) proteolysis index and (c) maturation time.

The circles and the error-bars show the average predicted value and standard deviation for the 8 replicate measurements, respectively. Bold lines show $y = x$ and dotted lines show the linear fit of predicted values.

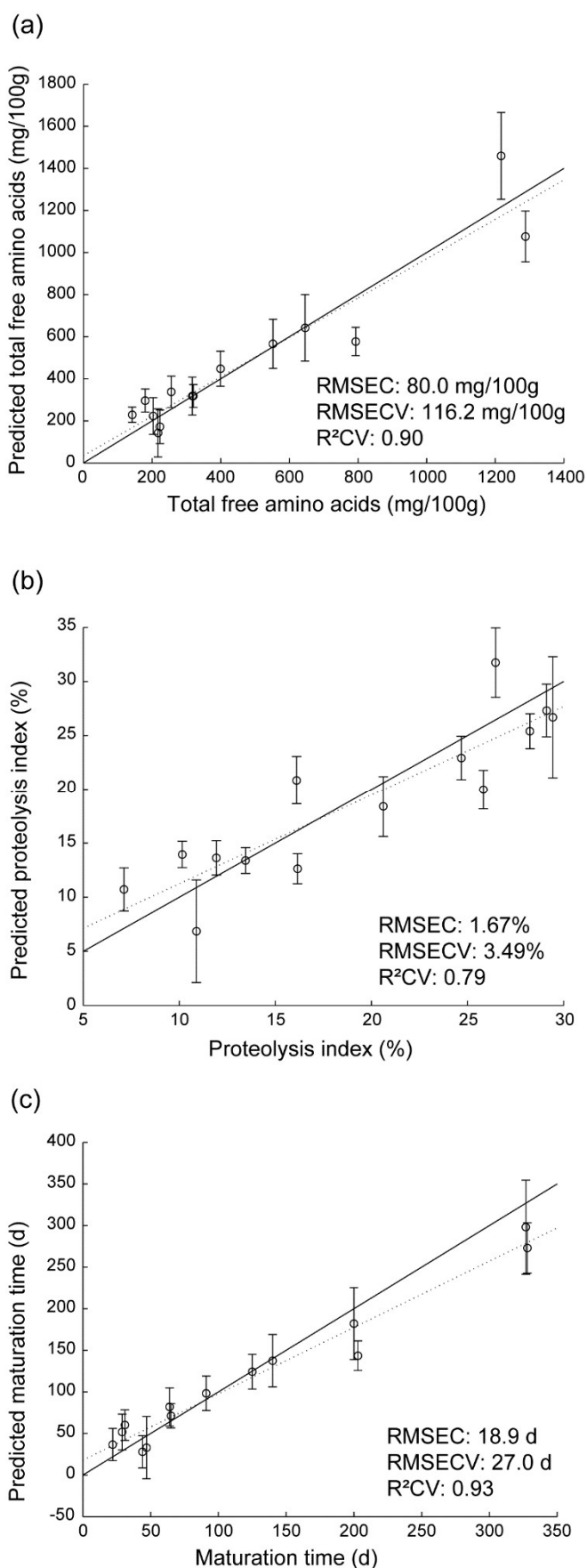
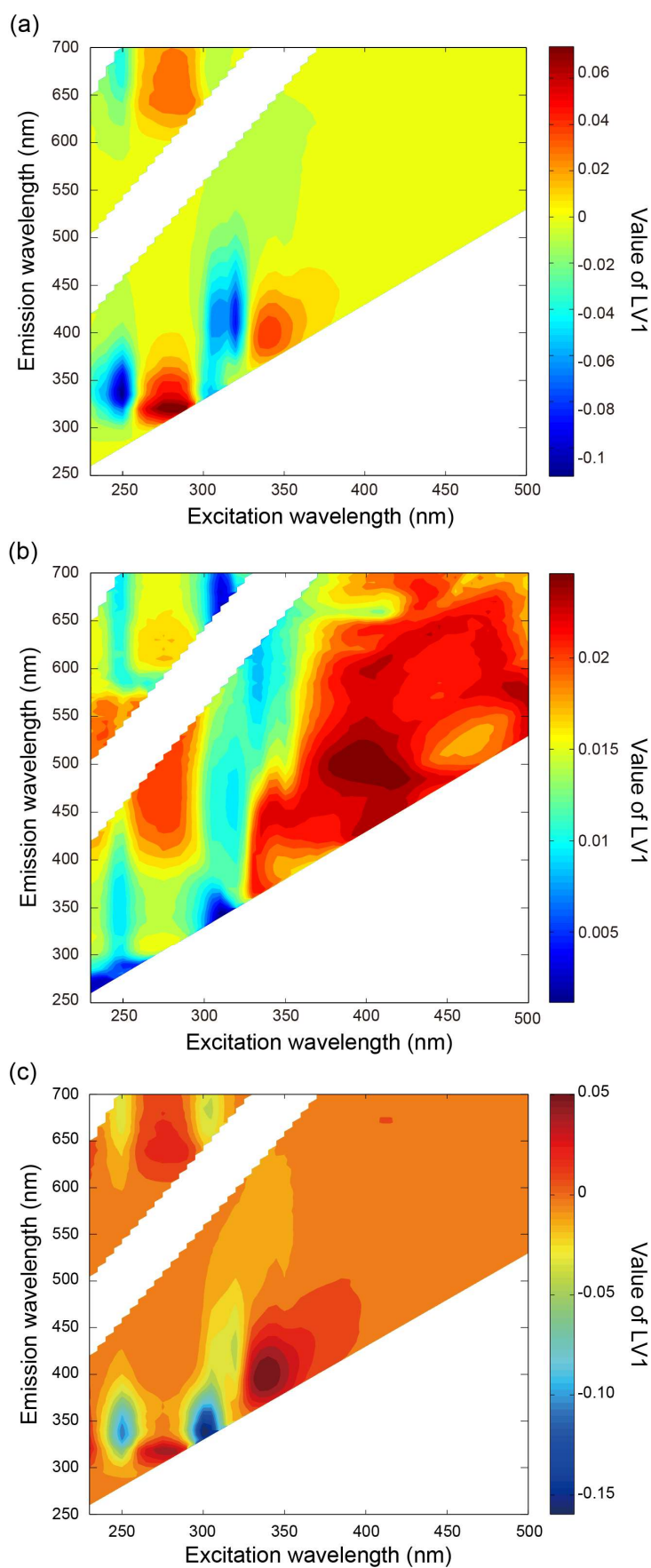


Fig. 3–4 Contour maps of loadings of 1st latent variable in each PLS model of (a) total free amino acids, (b) proteolysis index, and (c) maturation time.



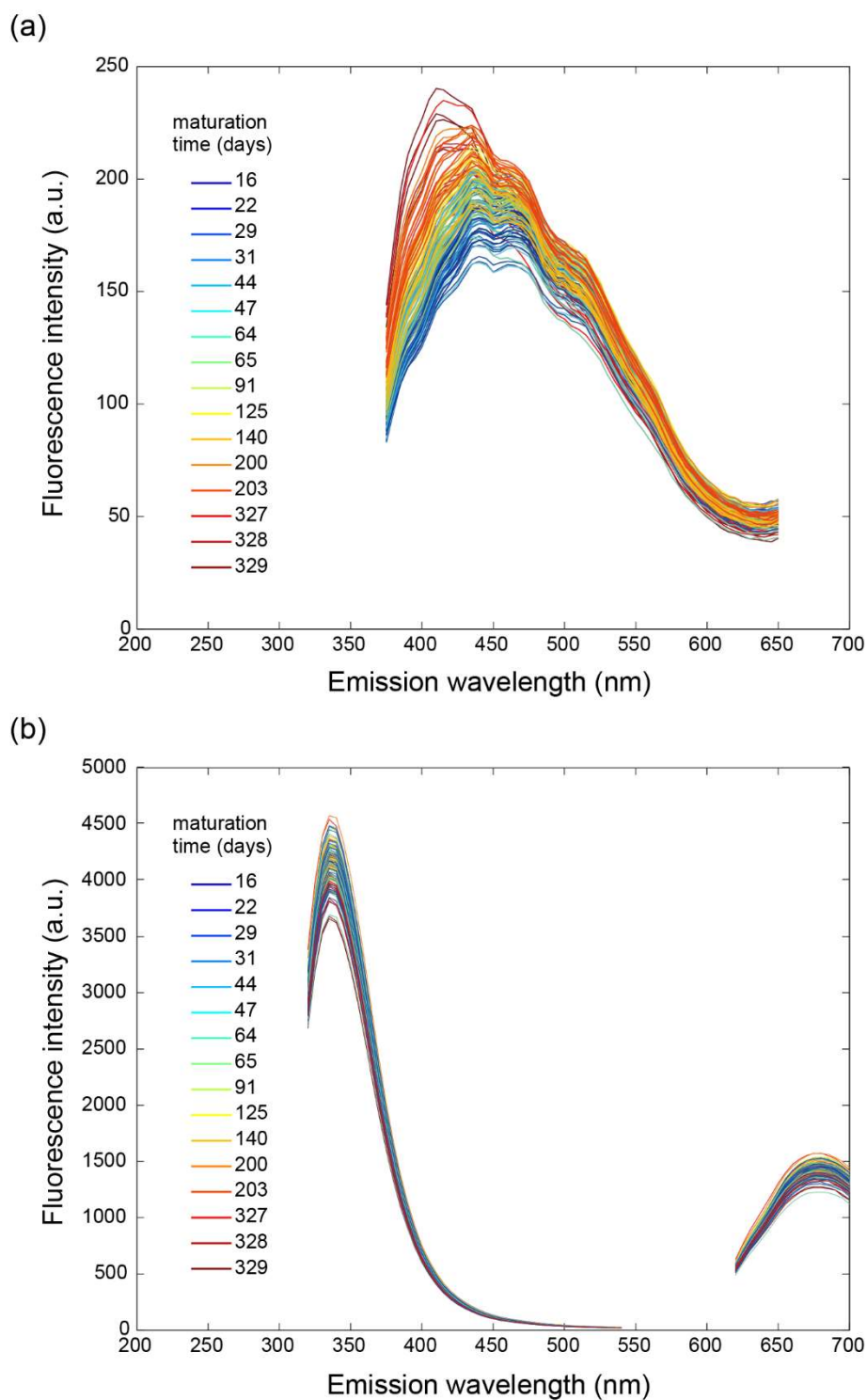


Fig. 3–5 Fluorescence emission spectra color coded by maturation times at excitation wavelength of (a) 345 nm and (b) 290 nm.

3-4 結論

蛍光指紋をチェダーチーズ熟成度指標値の評価に応用するにあたり、ノーマルタイプのチェダーチーズを対象に基礎的な検討をおこなった。化学的熟成度指標値（遊離アミノ酸含量、タンパク質分解度（水溶性窒素／全窒素））と熟成期間について、ノーマルタイプチェダーチーズ 16 サンプルの分析と蛍光指紋の測定により、推定モデル（PLS 回帰モデル）を作成し、推定精度について評価した。その結果、モデルの決定係数 R^2CV は遊離アミノ酸含量、タンパク質分解度、熟成期間でそれぞれ 0.79、0.90、0.93 であり、許容範囲内で推定可能であることが明らかとなった。遊離アミノ酸含量、熟成期間の第 1 潜在変数のローディングを探索することにより、メイラード反応や脂質酸化物に対応する波長域が見いだされた。また、この波長域の蛍光強度は熟成期間との相関が高い一方で、トリプトファンを含む芳香族アミノ酸類の波長域は、熟成期間との相関が低いことが明らかとなった。後者の波長域は、チーズが持つ蛍光では強度も高く優勢であり、従来の蛍光測定で多く用いられてきたが、蛍光指紋においては、その他の波長域の物質の蛍光の変化が、推定モデルの構築に寄与していることが明らかとなった。推定の精度のみでなく、この点においても蛍光指紋のような網羅的な解析が、従来の蛍光測定よりも利点のあることが示唆された。

本章では、16 点のサンプルにて基礎的な検討を行ったが、更に推定精度を上げ、堅牢なモデルとするためには、複数ロットに渡り、より多数のサンプルのデータを用いて推定モデルを構築することが必要である。

第4章 フレーバータイプチェダーチーズ熟成度指標値の 蛍光指紋による推定

4-1 序

第3章より、ノーマルタイプのチェダーチーズに関して、化学分析による熟成度指標値の推定が可能であること確認した。本章ではノーマルタイプよりも熟成が良く進んでおり品種特有のフレーバーが強く、組織の分解も進むフレーバータイプのチェダーチーズを用い、蛍光指紋による熟成度指標値の推定について更にその可能性の検討を行った。フレーバータイプのチーズは、ノーマルタイプのチーズに比べ、一般的に風味強度が強く、タンパク質の分解度合いや遊離アミノ酸の含量が高いという特徴を持ち、製造直後から熟成による変化がノーマルタイプに比べ大きい。異なるタイプのチェダーチーズでもノーマルタイプと同様に蛍光指紋による熟成度指標値の評価が可能であれば、他品種への応用に道を開くことができる。

4-2 材料および方法

【材料】

国産のフレーバータイプのチェダーチーズを使用し、製造ロットは11種類を準備した。ガスバリア性を有するフィルムにてバキュームシールし、15°Cで120日間保管した後、5°Cで保管した。測定は製造後14日から471日の期間で行った。測定のタイミングで同じチーズブロックから蛍光指紋測定用と化学分析用に分割し、それぞれの測定に使用した。化学分析用のチーズブロックは、熟成が進行しないように蛍光指紋測定日より2日以内に粉砕して冷凍保存(-18°C)を行い、化学分析に供した。

【化学分析】

タンパク質分解度(水溶性窒素/全窒素)、遊離アミノ酸含量、pHの測定は、第3章と同様の方法で実施した。遊離脂肪酸含量の測定は、チーズサンプルを有機溶媒にて抽出後、固相抽出にてクリーンアップし、ガスクロマトグラフ(7890A アジレント・テクノロジー株式会社)にて、

測定した (De Jong & Badings, 1990)。

【蛍光指紋測定】

サンプルの準備、蛍光指紋の測定条件は第3章と同様に行った。1種のサンプルにつき、チーズサンプルを入れ替えながら3回の測定を行った。

【熟成度指標値推定の PLS 回帰モデル作成】

蛍光指紋の測定値から熟成度指標値を推定するために、PLS 回帰モデルを作成した。多変量解析には、MATLAB software (R2016a, MathWorks Inc., USA) と PLS Toolbox (version 8.1.1, Eigenvector Inc., USA) を使用した。蛍光指紋のデータは、Yoshimura ら (2014) の方法に従って前処理を行った。最初に、蛍光波長より短い励起波長のデータを取り除いた。次に励起波長と同じ、もしくは、2倍、3倍の蛍光波長である1次、2次、3次散乱光を取り除いた (Fujita et al. 2010)。最後にノイズの多い励起波長 230 nm 以下の波長帯のカットを行った。そして残ったデータは、3612 条件の励起波長と蛍光波長の組み合わせからなる。

合計で 31 点の熟成度指標値と蛍光指紋のデータを用いて、PLS 回帰モデルの作成を行った。まず、データをトレーニングセット：テストセット=2:1 に分割した。次にトレーニングセットにてクロスバリデーションモデルを作成し、クロスバリデーションモデルの決定係数 (coefficient of determination of cross-validation: R^2CV) と予測誤差 (root mean square error of cross-validation: RMSECV) より最適な前処理と潜在変数を決定した。前処理は mean center, normalize + mean center, autoscale, normalize + autoscale の 4 処理およびその対数処理の計 8 種で比較した。潜在変数は scree plot 中の "knee" として知られる下降部分を見つける PLS Toolbox のアルゴリズムを使用して決定した (Henry et al. 1999)。次にその潜在変数と前処理を用いてトレーニングセットで予測モデルを作成した。更にその予測モデルをテストセットデータに適用し、推定精度を確認した。予測モデルの正確性に関しては、テストセットデータの決定係数 (coefficient of determination of prediction: R^2P) と予測誤差 (root mean square error of prediction: RMSEP) により評価した。更に、推定モデルへ寄与の高い波長域およびその物質について把握するため、第 1 潜在変数のローディング、variable importance in projection (VIP)、selectivity ratio (SR) により波長域の絞り込みを行った。波長域を選択するに当たっては、ローディングは全体

の|1.0%、VIP はVIP>1 且つ上位 5%、SR は Farrés ら (2015)より、SR>F 検定値 (95%) を寄与率が高い波長域の選択に採用した。更に、選択された各波長域の蛍光強度と熟成度指標値の相関係数: R、|R| > 0.5 の波長域を選択することとした。

4-3 結果および考察

4-3-1 化学分析結果

各サンプルにおける pH、タンパク質分解度、遊離アミノ酸含量、遊離脂肪酸含量の分析結果を Table 4-1 に示した。また、熟成期間における各熟成度指標値の推移を Fig. 4-1 に示した。

タンパク質分解度、遊離アミノ酸含量は製造後 160 日まで直線的に増加し、その後増加が緩やかとなる傾向であった。遊離脂肪酸含量は、熟成期間の初期から後期にかけて緩やかに増加しているようにも確認されたが、含量のばらつきが大きかった。

4-3-2 蛍光指紋測定結果

フレーバータイプチェダーチーズの標準的な蛍光指紋図を Fig. 4-2 に示した。励起波長 290–305 nm、蛍光波長 320–350 nm の範囲にピークが観察された。このピークはトリプトファンを含む芳香族アミノ酸のピークと判断した。他に励起波長 320 nm、蛍光波長 400 nm にも強度の高い波長域があり、こちらはビタミン A の波長と考えられた。いずれも第 3 章のノーマルタイプチェダーチーズの蛍光指紋図と同様のピーク位置であった。

4-3-3 熟成度指標値推定モデルの作成および寄与する物質の探索

【遊離アミノ酸含量】

トレーニングデータセットにて、最適な前処理および潜在変数を決定するために、クロスバリデーションモデルを作成した結果を Table 4-2 に示した。normalize + autoscale の前処理で潜在変数 6 の時に最も精度が高く、その R²CV は 0.897、RMSECV は 581 mg/100g であった。分析の最大値における RMSECV の割合は 9.2%であった。この前処理と潜在変数を使用し、トレーニングセットで予測モデルを作成したのが Fig. 4-3-(a) であり、R²C は 0.96、RMSEC は 348 mg/100g であった。更にトレーニングモデルにテス

トデータセットを当てはめ、推定モデルの精度を確認した。 R^2P は 0.97、RMSEP は 350 mg/100g であった (Fig. 4-3-(b))。テストセットモデルにおいても高い決定係数 ($R^2P = 0.97$) と小さい予測誤差 (RMSEP = 350 mg/100g) が得られたことから、本モデルは遊離アミノ酸含量の推定に有効であると考えられた。更に精度を向上するためには、遊離アミノ酸含量の分布が均一となるようにサンプルを選定することや、サンプル数の増加が望まれる。

Fig. 4-4 に、PLS 回帰モデルに寄与する波長範囲の確認を行うために、第 1 潜在変数のローディングスコア、VIP スコア、SR スコアを等高線図に再表示した。ここから「4-2 材料および方法」に示した方法で選定された波長域が Table 4-3-(a) である。SR における F 検定値 (95%) の値は、1.5322 であった。励起波長/蛍光波長 260 nm / 290 nm, 300–305 nm / 700 nm, 395–405 nm / 450–470 nm, 405 nm / 635 nm の 5 つの波長域が選定された。

励起波長 260 nm、蛍光波長 290 nm の波長域は、遊離アミノ酸含量が高くなるにつれ蛍光強度が減少しており、その蛍光の相関係数は-0.57 であった。この波長域は Kulmyrzaev ら (2005)、Christensen ら (2006) や Lakowicz (2006) により述べられているように、芳香族アミノ酸のうち、フェニルアラニン (励起波長/蛍光波長 = 260 nm / 284 nm)、チロシン (励起波長/蛍光波長 = 275 nm / 304 nm) と推測される。チーズ中のタンパク質が熟成に伴い分解されるに伴うこれらアミノ酸周辺の構造変化により、蛍光強度に変化が起きたものと考えられた。また、チーズではアミノ酸のうちトリプトファンが強く蛍光を発するが、Fig. 4-2 の平均の蛍光指紋図において、本波長域とは異なった波長域にピークがあることから、この波長域には該当しないと考えられた。

また、励起波長 395–405 nm、蛍光波長 450–470 nm の波長域については、遊離アミノ酸含量が増加するほど蛍光強度が増加していて、遊離アミノ酸含量と励起波長 395 nm、蛍光波長 470 nm における蛍光強度の相関係数は、0.64 であった。この領域で最も報告例が多いのがアミノ酸、タンパク質と脂質酸化物による反応生成物である。

Kikugawa ら (1985) は、脂質酸化により生成した malondialdehyde (MDA) と lysine monomer の反応生成物が最大励起波長 395 nm、最大蛍光波長 466–470 nm を持つことを報告している。また、MDA とモデルタンパクである polylysine との反応生成物が最大励起波長 398 nm、最大蛍光波長 470 nm を持つことを報告している。同筆者らにより (Kikugawa & Beppu, 1987)、組織や細胞内での脂質酸化による蛍光物質の生成として、

monofunctional aldehyde の存在下において MDA と primary amines の反応が促進され、fluorescent 1,4-disubstituted-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarbaldehydes が生成し、その最大励起波長が 386–403 nm、最大蛍光波長が 444–465 nm を示す報告がある。また Yamaki ら (1992) は hexenal と glycine ethyl の反応生成物が最大励起波長 392 nm、最大蛍光波長 455 nm を示すことを報告している。Veberg ら (2006b) は、励起波長を 382 nm に固定し、脂質酸化物（アルデヒド）とアミノ酸の反応生成物に関する蛍光について報告をしている。彼らは lysine と 2-hexenal の反応産物が 471 nm の最大蛍光、lysine と 2,4-heptadienal の反応産物が 472 nm の最大蛍光を持つことを見出した。また、malondialdehyde と glycine の反応物が 465–469 nm の最大蛍光、lysine との反応物で 467–469 nm の最大蛍光を発することを報告している（共に励起波長 382 nm）。しかもそれらは、食品の冷蔵保管温度である 4°C の条件下でも生成することを明らかにした。また同筆者ら (Veberg, Olsen, Nilsen, & Wold, 2007) は、光照射時のバターにおける脂質酸化物の最大蛍光波長が 465–470 nm にあることを報告し、salted cod, turkey, chicken meat, and salmon pa^ te といった食品の種類によらず 470 nm 付近に脂質酸化物の蛍光波長のピークがあることを示唆している。今回の実験では保管中の光照射を行っていないが、長期保管によりこれら脂質酸化物が生成することも考えられる。

励起波長 330 nm、蛍光波長 380–385 nm の波長域についても遊離アミノ酸含量が増加するほど蛍光強度が増加していて、遊離アミノ酸含量と励起波長 330 nm、蛍光波長 385 nm における蛍光強度の相関係数は 0.54 であった。この波長域に該当する物質は、Morales ら (1997) により報告のある、メイラード反応生成物の一つであるペントシジン (Pentosidine) 様の物質と推測される。彼らの報告によれば、カゼインナトリウムと乳糖の溶解液の加熱時間を長くすることより、出現する蛍光波長のピークが典型的な AGEs (Advanced Glycation End-products: 終末糖化生成物) の蛍光波長 (415 nm) よりも低波長側にシフトしていくことを報告している。典型的な AGEs とは異なる蛍光波長をもつ AGEs として Pentosidine を挙げており、その波長域は励起波長 335 nm、蛍光波長 385 nm である。

300–305 nm / 700 nm, 405 nm / 635 nm はいずれも遊離アミノ酸含量の増加とともに減少を示す波長域である。これら波長域はポルフィリン類の蛍光であると推測される。Wold ら (2005) はノルベジアチーズに様々な色のフィルムを通して光照射を行い、光酸化で生じる蛍光の変化について励起波長を 380 nm に固定して研究しており、ポルフィ

リン類やクロリン類が乳製品に存在していること、および光照射により分解され風味変化に関与することを報告している。彼らは、ヤールスバーグチーズにポルフィリン類やクロリン類を塗布した表面の蛍光測定にて、励起波長 380 nm の時、プロトポルフィリン (Protoporphyrin) のピークが蛍光波長 635 nm および 705 nm、ヘマトポルフィリン (Hematoporphyrin) のピークが 622 nm、クロロフィル a (Chlorophyll a) のピークが蛍光波長 672 nm、クロロフィル b (Chlorophyll b) のピークが蛍光波長 661 nm、またウロポルフィリン (uroporphyrin) のピークが 618 nm にあることを示している。彼らは蛍光波長 600–750 nm のピークが、ポルフィリン類やクロリン類の蛍光によるものと述べており、今回着目された波長域と一致している。また彼らは励起波長として 380 nm を使用していたが、ポルフィリン類の蛍光測定を行うには励起波長は 410 nm がより好ましいと述べている。Durek ら (2012) によれば、豚肉の例において、Protoporphyrin IX の最適な励起波長/蛍光波長は 400 nm / 633 nm であると述べており、同様に今回着目した波長域と一致する。

以上より、遊離アミノ酸含量の推定モデルに関しては、芳香族アミノ酸（チロシン、フェニルアラニン）、タンパク質、アミノ酸と脂質酸化物による反応生成物、脂質酸化物、メイラード反応生成物、ポルフィリン類の蛍光がモデルに高く寄与していることが示唆された。

【遊離脂肪酸含量】

遊離アミノ酸含量の推定モデル作成と同様にモデルの作成を行った。クロスバリデーションモデルの前処理による精度の比較を Table 4-2 に示した。log10+mean center の前処理で潜在変数 8 の時に最も精度が高かったが、その R^2CV は 0.418、 $RMSECV$ は 197 mg/kg であり、決定係数が低かった。分析値の最大値における $RMSECV$ の割合は 9.1% であった。この前処理と潜在変数を使用し、トレーニングセットで予測モデルを作成したのが Fig. 4-5-(a) であり、 R^2C は 0.89、 $RMSEC$ は 90 mg/kg であった。更にトレーニングモデルにテストデータセットを当てはめ、予測モデルの精度を確認した。 R^2P は 0.630、 $RMSEP$ は 156 mg/kg であった (Fig. 4-5-(b))。トレーニングセットモデル、テストセットモデルにおいて決定係数が低く、精度の低下が確認されたことから、本モデルにて遊離脂肪酸含量の推定を行うには更なる検討が必要と考えられた。今回対象としたフレーバータイプのチェダーチーズの特徴として、遊離脂肪酸の含量がサンプルによりばらつ

きが大きいこと、熟成期間の増加に伴い顕著な増加を示さないことが主な要因として考えられた。

【タンパク質分解度（水溶性窒素／全窒素）】

タンパク質分解度の推定モデル作成についても、前記項目と同様に行った。クロスバリデーションモデルでは、log10+normalize+autoscale の前処理が最も精度が高く、 $R^2CV = 0.86$ 、 $RMSECV = 3.6\%$ であった (Table 4-2)。分析値の最大値における $RMSECV$ の割合は 8.6%であった。この前処理と潜在変数を使用し、トレーニングセットで予測モデルを作成したのが Fig. 4-6-(a)であり、 R^2C は 0.96、 $RMSEC$ は 1.92%であった。更にトレーニングセットモデルにテストデータセットを当てはめ、推定モデルの精度を確認した。 R^2P は 0.95、 $RMSEP$ は 2.1%であった (Fig. 4-6-(b))。テストセットモデルにおいても高い決定係数と小さい予測誤差であったので、本推定モデルはタンパク質分解度の推定に有効と考えられた。

Fig. 4-7 に、PLS 回帰モデルに寄与する波長範囲の確認を行うために、第 1 潜在変数のローディングスコア、VIP スコア、SR スコアを等高線図に再表示した。ここから「4-2 材料および方法」に示した方法で選定された波長域が Table 4-3-(b) である。SR における F 検定値 (95%) の値は、1.5322 であった。

励起波長/蛍光波長 = 250 nm / 290 nm (アミノ酸類)、400–405 nm / 450–475 nm (タンパク質、アミノ酸と脂質酸化物による反応生成物)、400–405 nm / 630–635 nm (ポルフィリン類) の各波長域については、上述の遊離アミノ酸含量の推定時にもモデル精度への貢献が高いと挙げられた波長域と同様であった。

励起波長 345–350 nm、蛍光波長 425–435 nm の波長域については、いくつかの報告がある。Stapelfeldt & Skibsted (1994) は乳製品と β -lactoglobulin のモデルシステムにて蓄積する secondary lipid oxidation products (二次酸化脂質生成物) が励起波長 350 nm で 410 nm の蛍光を示すことを報告している。Morales ら (1996) は、乳糖および乳糖とカゼイン、ホエイタンパク質の混合物や生乳の加熱時間によるメイラード反応生成物の変化について、励起波長 347 nm、蛍光波長 415 nm で測定し、加熱時間が長くなるほど蛍光強度が増加することを報告している。また、Birlouez-Aragon ら (1998) は生乳および乳飲料中の熱履歴の迅速確認法として、メイラード反応生成物の蛍光を励起波長 350 nm、蛍光波長 440 nm でモニタリグしている。また Christensen ら (2003) は同様の波長域の蛍

光が光照射下で保管したプロセスチーズ中にも増加することを報告している。これら報告より、この波長域の蛍光はメイラード反応生成物および脂質酸化生成物によるものと考えられた。

励起波長 415 nm、蛍光波長 585 nm の波長域については、Veberg ら (2006a) により、豚肉において Zn protoporphyrin の蛍光のピークを励起波長 382 nm、蛍光波長 590 nm で検出しており、最適な励起波長、蛍光波長は 420 nm、583–589 nm であると報告している。また彼らはその蛍光強度がバキュームシールした嫌気状態の包装下において、他のポルフィリン類とともに増加するとも報告している。タンパク質分解度の推定モデルに関しては、他のポルフィリン類の蛍光波長域がタンパク質分解度と負の相関であるのに対し、この波長域のみが正の相関であることから、彼らの報告とは整合性が取れてない。乳製品における Zn protoporphyrin の挙動に関する詳細な報告は確認されておらず、本波長域に関しては更なる調査が必要である。

【熟成期間】

熟成期間の推定モデル作成についても、前記項目と同様に行った。クロスバリデーションモデルでは、normalize + autoscale の前処理が最も精度が高く、 $R^2CV = 0.88$ 、 $RMSECV = 49$ d であった (Table 4-2)。総熟成期間における $RMSECV$ の割合は 10.4% であった。この前処理と潜在変数を使用し、トレーニングセットモデルを作成したのが Fig. 4-8-(a) であり、 R^2C は 0.93、 $RMSEC$ は 38 d であった。更にトレーニングセットモデルにテストデータセットを当てはめ、推定モデルの精度を確認した。 R^2P は 0.76、 $RMSEP$ は 74 d であった (Fig. 4-8-(b))。テストセットモデルにおいて、やや精度が低下したものの、対象とする熟成期間の限定、熟成期間のバランスが均等なサンプルの選定やサンプル数量の改善により、更に精度を向上させることが可能と考えられた。

Fig. 4-9 には、PLS 回帰モデルに寄与する波長範囲の確認を行うために、第 1 潜在変数のローディングスコア、VIP スコア、SR スコアを等高線図に再表示した。ここから「4-2 材料および方法」に示した方法で選定された波長域が Table 4-3-(c) である。SR における F 検定値 (95%) の値は、1.5322 であった。

励起波長/蛍光波長 = 250 nm / 290 nm (アミノ酸類)、405 nm / 445–450 nm (タンパク質、アミノ酸と脂質酸化物による反応生成物)、310 nm / 670 nm (ポルフィリン類) の各波長域については、上述の遊離アミノ酸含量、タンパク質分解度の推定時にもモデル

精度への貢献が高いと挙げられた波長域と同様であった。

励起波長 385 nm、蛍光波長 505 nm の波長域については、Veberg ら (2006b) により、励起波長 382 nm の蛍光スペクトルにおいて、リジンとアルデヒド類の反応生成物が、510 nm 付近にショルダーのあるスペクトルを示すことを報告している。また励起波長 415 nm、蛍光波長 505 nm の波長域に関しては、Yamaki ら (1992) により、ヘキサジエンール (Hexadienal) とグリシンエチル (Glycine ethyl) の反応生成物が示す蛍光のピークの 하나가励起波長 426 nm、蛍光波長 505 nm を示すことを報告している。これらはいずれもアミノ酸とアルデヒド類との反応生成物の波長域であり、上述で挙げているタンパク質、アミノ酸と脂質酸化物による反応生成物と同様に熟成期間の推定モデルの精度に貢献していることが推察された。

励起波長 300 nm、蛍光波長 395 nm の波長域については Airado-Rodríguez ら (2011) により、ワインの例だが、スチルベン様の非フラボノイドポリフェノールの t-Resveratrol, t-Piceid, t-Astringin の蛍光が、励起波長 290–300 nm、蛍光波長 390–400 nm に検出されることを報告している。ポリフェノール類に関してチーズの熟成中の変化を報告した研究はほぼ確認されないが、熟成期間に対し負の相関を持っていることから、熟成期間が長くなると共にこれらポリフェノール類が減少していき、推定モデルの精度に寄与することが示唆された。

Table 4-1 Chemical analysis results in each cheddar cheese sample.

サンプル No.	製造後日数 (熟成期間)	pH	熟成度 (%)	遊離アミノ酸 (mg/100g)	遊離脂肪酸 (mg/kg)
1	398	5.34	37.4	5713	1641
2	376	5.27	36.6	5375	1771
3	335	5.28	35.5	5060	1657
4	272	5.22	34.4	4887	1397
5	153	5.35	36.3	4829	2025
6	104	5.24	30.8	3333	1737
7	14	4.90	8.4	362	1149
8	433	5.32	38.6	5503	1499
9	411	5.27	37.9	4639	1512
10	370	5.31	37.9	4942	1429
11	307	5.27	36.0	4649	1164
12	188	5.39	37.8	4634	1716
13	139	5.41	35.5	3577	1591
14	49	5.31	21.6	1229	1332
15	20	5.25	9.7	286	1021
16	422	5.18	36.9	5287	1484
17	303	5.55	40.7	5804	2165
18	254	5.50	38.6	4924	1933
19	164	5.34	37.9	4614	1847
20	135	5.27	32.1	4063	1442
21	87	5.19	24.7	2255	1637
22	52	5.32	20.5	1336	1609
23	16	5.21	8.3	422	1304
24	471	5.24	37.9	5648	1437
25	352	5.34	41.5	6338	1990
26	303	5.39	38.2	5273	1774
27	213	5.33	37.2	4900	1668
28	184	5.25	34.8	4773	1375
29	136	5.27	33.3	3883	1558
30	101	5.26	31.1	3151	1485
31	65	5.27	23.9	2403	1411

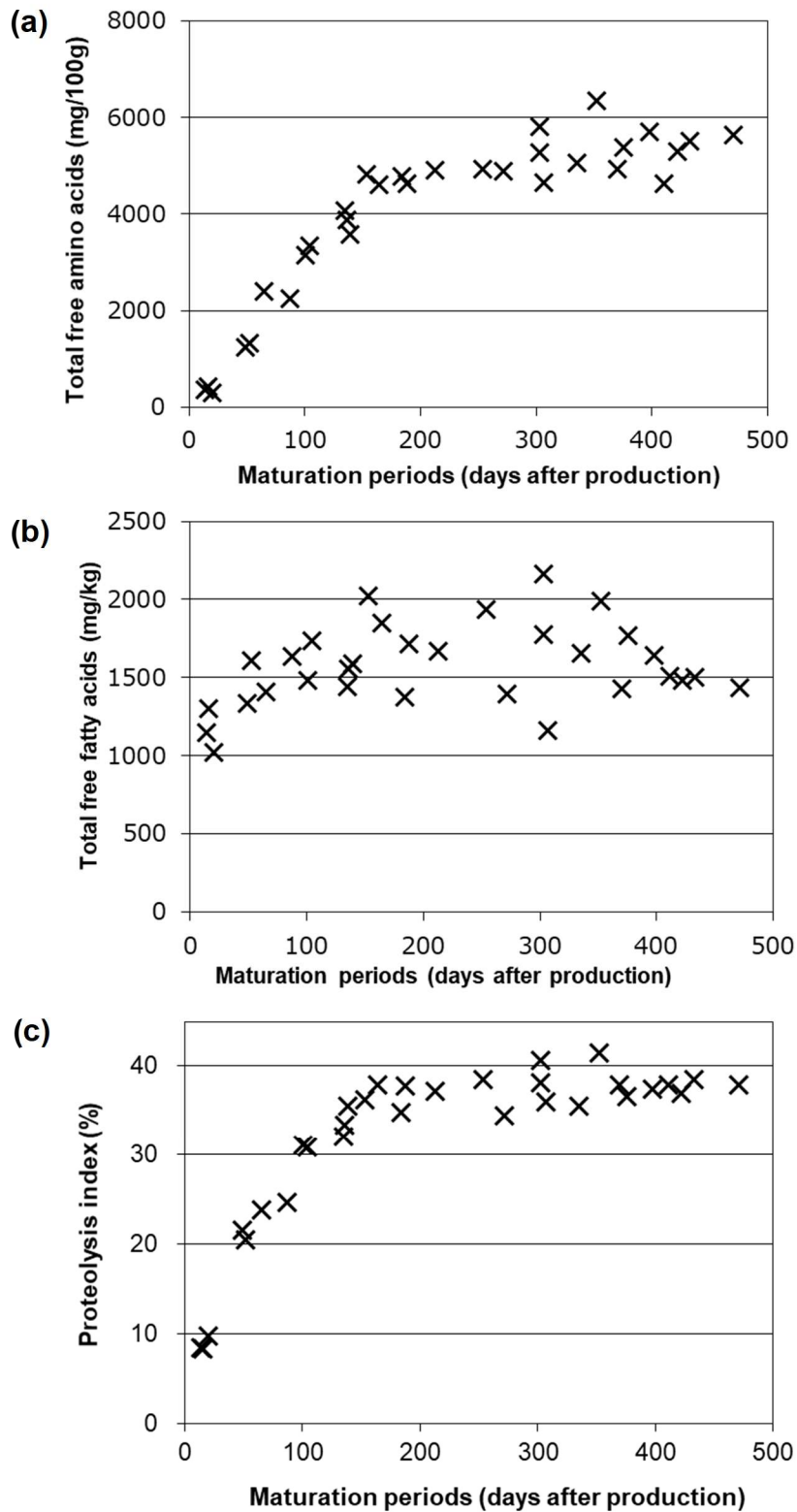


Fig. 4-1 Transition of each maturity index in the maturation period (Days after production).

(a) Total free amino acids, (b) Total free fatty acids, (c) Proteolysis index

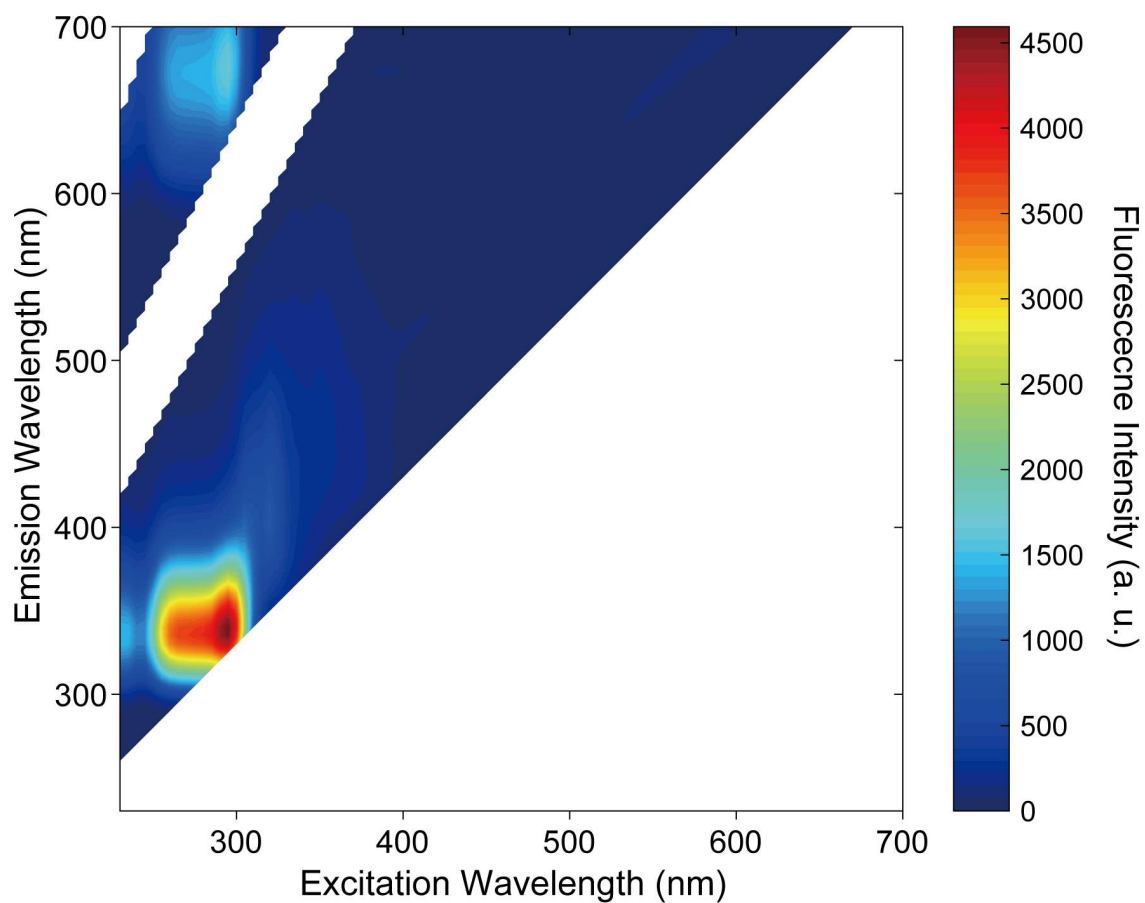
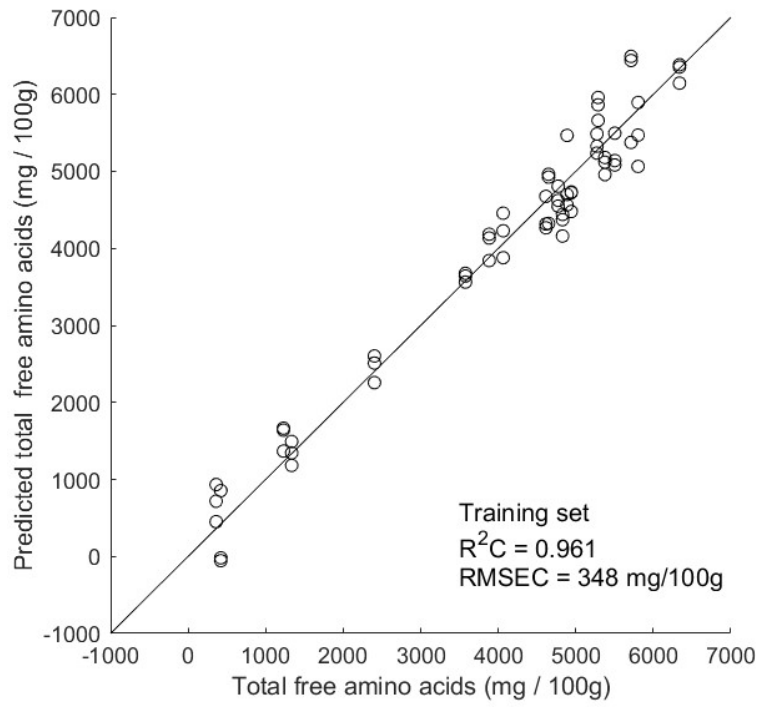


Fig. 4-2 Typical fluorescent fingerprint contour maps of flavor type cheddar cheese in range of normal intensities (0–4500 intensity (a.u.)).

Table 4–2 Cross-validation results to predict total free amino acids, total free fatty acids, proteolysis index, and maturation time with different preprocessing methods. Abbreviations are; LVs: latent variables, RMSECV: root mean square error of cross-validation, R²CV: coefficient of determination of cross-validation.

Free amino acids			
Pretreatment	LVs	RMSECV (mg/100g)	R ² CV
Mean center	3	700	0.848
Normalize+mean center	3	684	0.852
Autoscale	6	675	0.857
Normalize+autoscale	6	581	0.894
Log10+mean center	7	671	0.862
Log10+normalize+mean center	6	692	0.850
Log10+autoscale	5	759	0.821
Log10+normalize+autoscale	5	715	0.838
Free fatty acid			
Pretreatment	LVs	RMSECV (mg/kg)	R ² CV
Mean center	3	261	0.129
Normalize+mean center	2	266	0.116
Autoscale	5	240	0.271
Normalize+autoscale	4	235	0.287
Log10+mean center	8	197	0.484
Log10+normalize+mean center	7	213	0.398
Log10+autoscale	5	248	0.236
Log10+normalize+autoscale	7	207	0.437
Proteolysis index			
Pretreatment	LVs	RMSECV (%)	R ² CV
Mean center	3	3.89	0.841
Normalize+mean center	2	5.05	0.716
Autoscale	6	3.93	0.827
Normalize+autoscale	6	3.59	0.858
Log10+mean center	6	4.10	0.815
Log10+normalize+mean center	6	3.99	0.826
Log10+autoscale	6	4.08	0.815
Log10+normalize+autoscale	7	3.58	0.859
Maturation time			
Pretreatment	LVs	RMSECV (d)	R ² CV
Mean center	5	53.5	0.851
Normalize+mean center	4	51.1	0.865
Autoscale	5	60.3	0.811
Normalize+autoscale	4	48.8	0.878
Log10+mean center	5	60.2	0.816
Log10+normalize+mean center	5	56.7	0.832
Log10+autoscale	5	56.6	0.834
Log10+normalize+autoscale	5	56.6	0.835

(a)



(b)

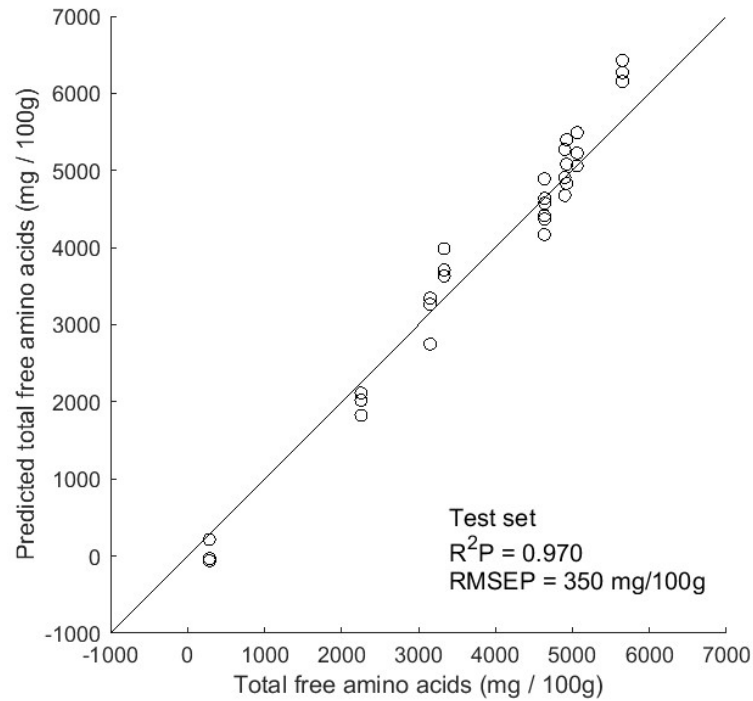
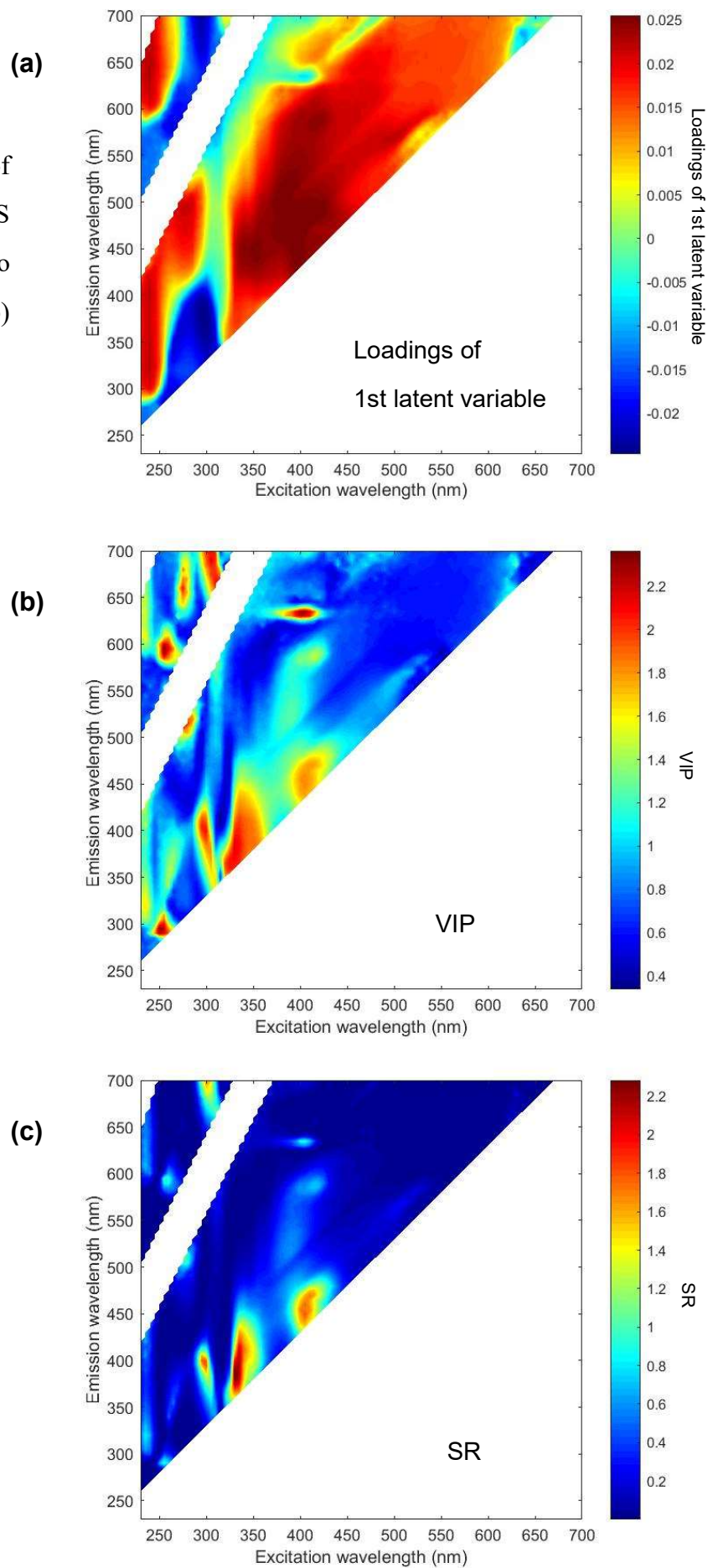
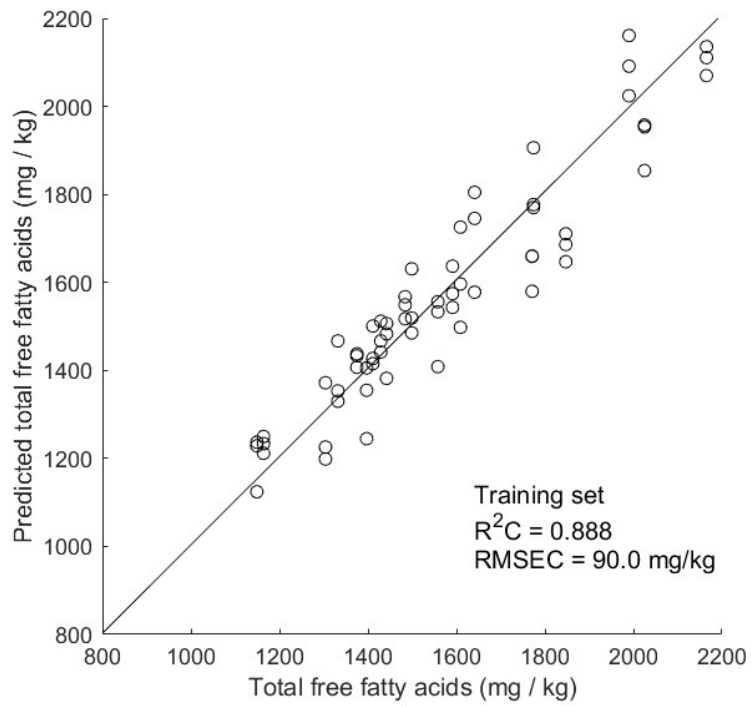


Fig. 4-3 Comparison between predicted value and measured value of total free amino acids. (a) Training set, (b) Test set

Fig. 4-4 Contour maps of each score in the PLS model of total free amino acids: (a) Loading (1st), (b) VIP, and (c) SR.



(a)



(b)

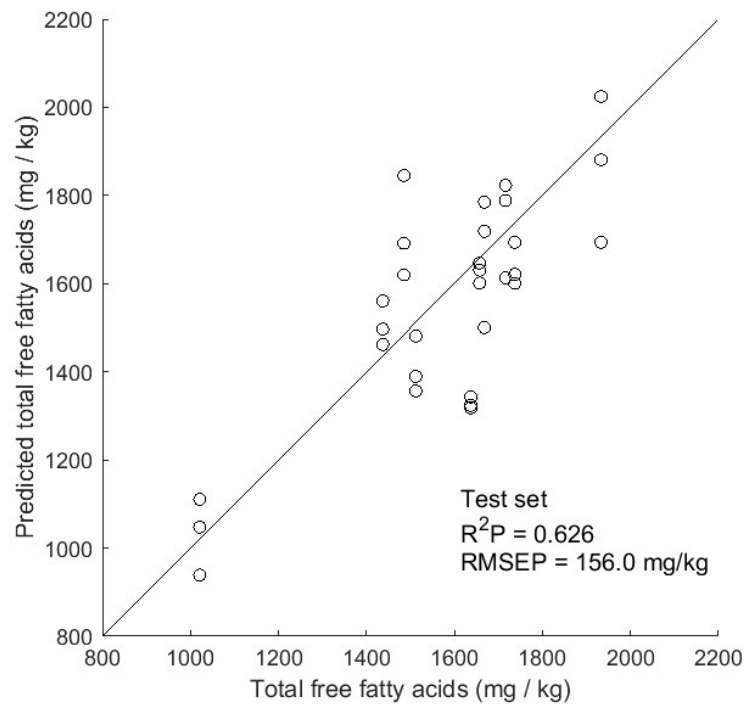
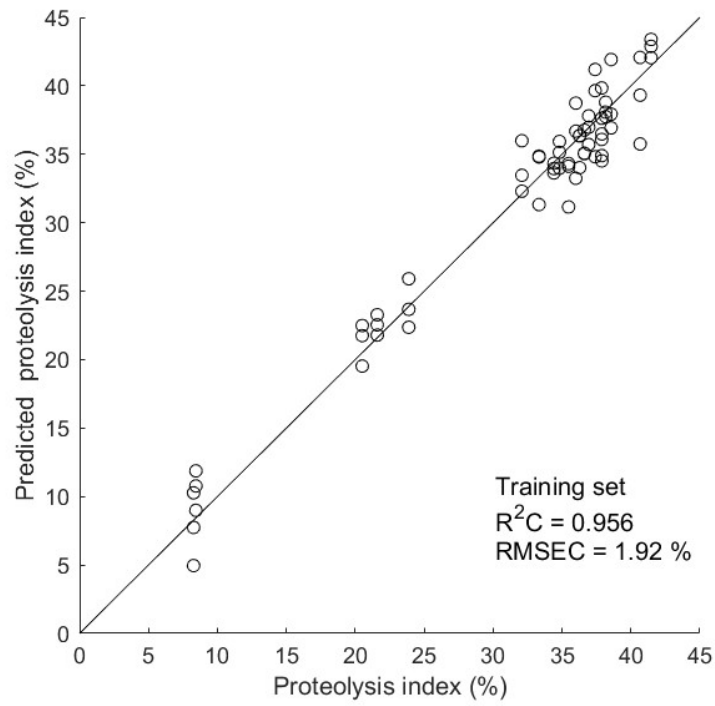


Fig. 4-5 Comparison between predicted value and measured value of total free fatty acids. (a) Training set, (b) Test set

(a)



(b)

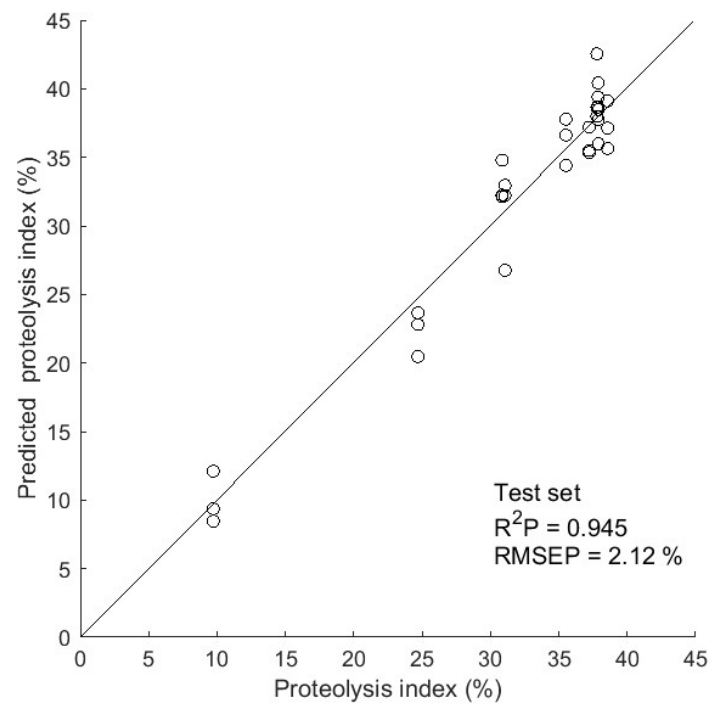
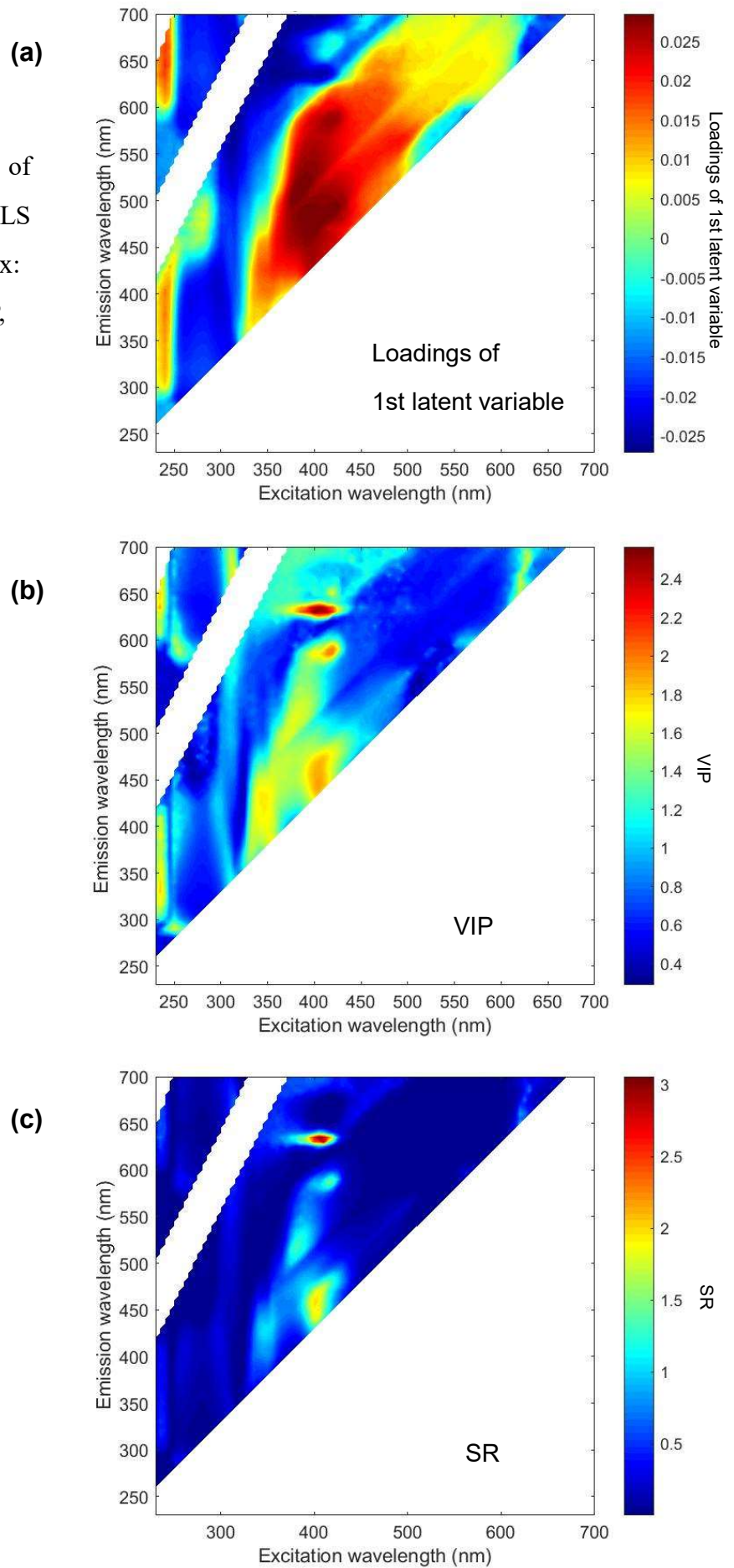


Fig. 4–6 Comparison between predicted value and measured value of proteolysis index. (a) Training set, (b) Test set

Fig. 4-7 Contour maps of each score in the PLS model of proteolysis index: (a) Loading (1st), (b) VIP, and (c) SR.



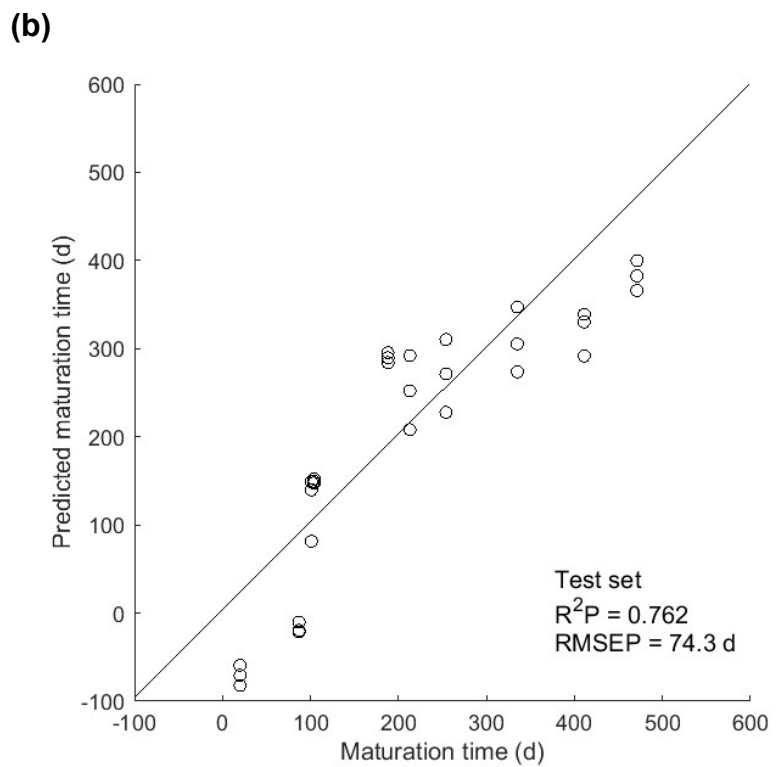
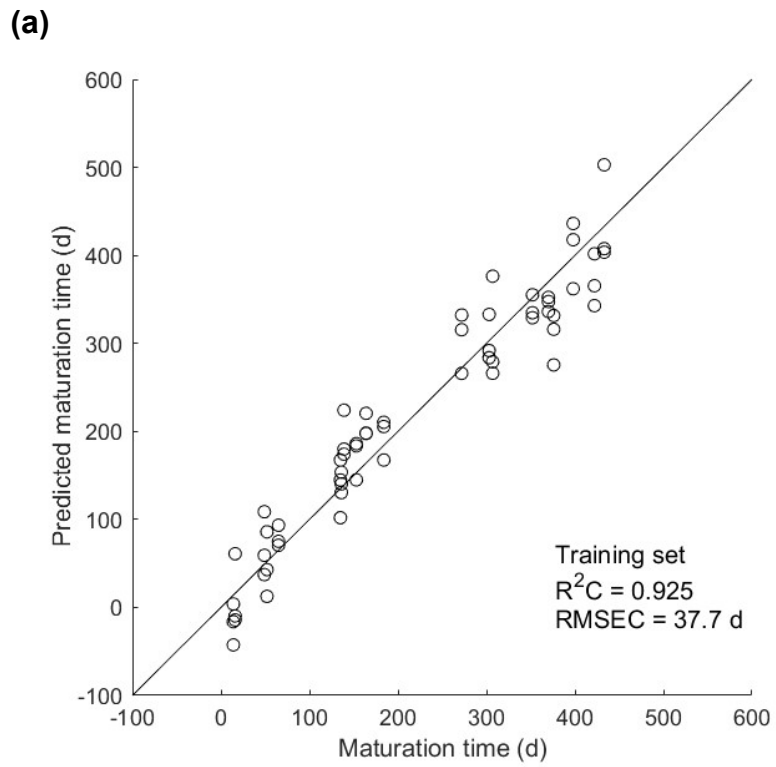


Fig. 4-8 Comparison between predicted value and measured value of maturation time. (a) Training set, (b) Test set

Fig. 4-9 Contour maps of each score in the PLS model of maturation time: (a) Loading (1st), (b) VIP, and (c) SR.

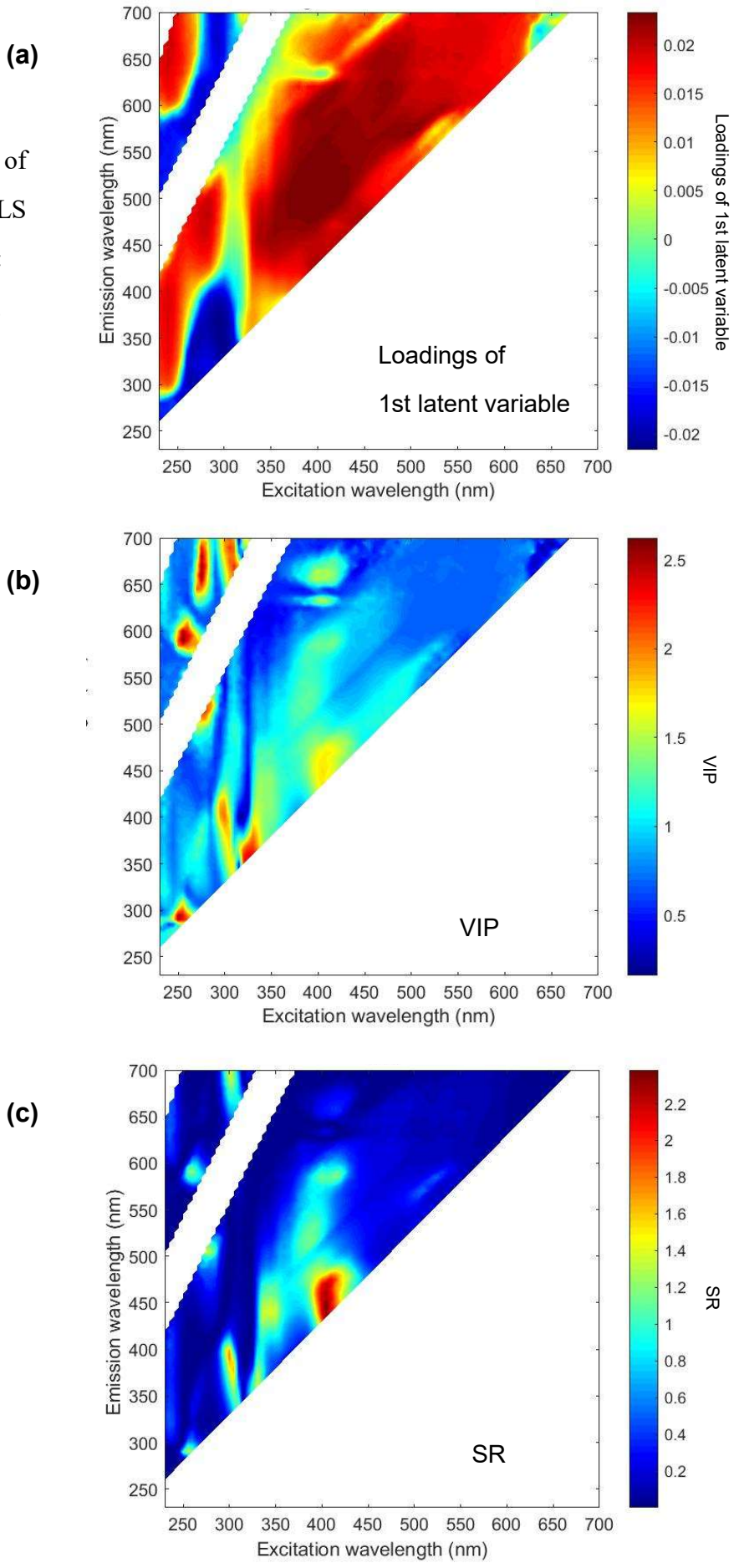


Table 4-3 List of wavelength regions and corresponding substances which contribute to each prediction model.

(a) Total free amino acids, (b) Proteolysis index, and (c) Maturation time

(a) 遊離アミノ酸含量 (total free amino acids)		Excitation wavelength (nm)	Emission wavelength (nm)	対応物質	参照
指標	スコア	相関係数			
Loadings of 1st LV	-0.02	-0.57	260	芳香族アミノ酸類	Klumyzaevy et al. (2005), Christensen et al. (2006), Lakowicz (2006)
	0.03	0.64	395	アミノ酸、タンパク質と脂質酸化物による反応生成物、脂質酸化物	Kikugawa et al. (1985, 1987), Yamaki et al. (1992), Veberg et al. (2006a, 2007)
VIP	4.58	-0.50	305	ポルフィリン類	Wold et al. (2005), Christensen et al. (2006)
	4.61	0.56	330	Pentosidine(メイラード反応生成物)	Morales & van Boekel (1997)
	3.36	0.69	405	アミノ酸、タンパク質と脂質酸化物による反応生成物、脂質酸化物	Kikugawa et al. (1985, 1987), Yamaki et al. (1992), Veberg et al. (2006a, 2007)
	5.36	-0.57	635	ポルフィリン類	Wold (2005), Christensen (2006) Review
SR	1.70	-0.50	300	ポルフィリン類	Wold et al. (2005), Christensen et al. (2006)
	2.30	0.54	330	Pentosidine(メイラード反応生成物)	Morales & van Boekel (1997)
	1.81	0.69	405	アミノ酸、タンパク質と脂質酸化物による反応生成物、脂質酸化物	Kikugawa et al. (1985, 1987), Yamaki et al. (1992), Veberg et al. (2006a, 2007)
(b) タンパク質分解度 (proteolysis index)		Excitation wavelength (nm)	Emission wavelength (nm)	対応物質	参照
指標	スコア	相関係数			
Loadings of 1st LV	0.03	0.57	400	アミノ酸、タンパク質と脂質酸化物による反応生成物、脂質酸化物	Kikugawa et al. (1985, 1987), Yamaki et al. (1992), Veberg et al. (2006a, 2007)
VIP	2.66	-0.53	250	芳香族アミノ酸類	Klumyzaevy et al. (2005), Christensen et al. (2006), Lakowicz (2006)
	3.03	0.59	345	メイラード反応生成物	Morales et al. (1996), Birloues-Aragon et al. (1998), Christensen et al. (2003)
	6.68	-0.56	400	ポルフィリン類	Wold et al. (2005), Christensen et al. (2006), Durek et al. (2012)
	3.72	0.62	405	アミノ酸、タンパク質と脂質酸化物による反応生成物、脂質酸化物	Kikugawa et al. (1985, 1987), Yamaki et al. (1992), Veberg et al. (2006a, 2007)
	3.99	0.56	415	Zinc protoporphyrin	Veberg et al. (2006a), Durek et al. (2012)
SR	2.00	0.63	400	アミノ酸、タンパク質と脂質酸化物による反応生成物、脂質酸化物	Kikugawa et al. (1985, 1987), Yamaki et al. (1992), Veberg et al. (2006a, 2007)
	3.08	-0.65	405	ポルフィリン類	Wold et al. (2005), Christensen et al. (2006), Durek et al. (2012)
(c) 熟成期間 (maturation time)		Excitation wavelength (nm)	Emission wavelength (nm)	対応物質	参照
指標	スコア	相関係数			
Loadings of 1st LV	0.02	0.57	385	リジン+アルデヒドの反応生成物(シオルダー)	Veberg et al. (2006b)
	0.02	0.53	415	Hexadecyl-H-Glycine ethylの反応生成物	Yamaki et al. (1992)
VIP	6.25	-0.62	250	芳香族アミノ酸類	Klumyzaevy et al. (2005), Christensen et al. (2006), Lakowicz (2006)
	4.95	-0.62	310	ポルフィリン類	Wold et al. (2005), Christensen et al. (2006)
	3.09	0.65	405	アミノ酸、タンパク質と脂質酸化物による反応生成物、脂質酸化物	Kikugawa et al. (1985, 1987), Yamaki et al. (1992), Veberg et al. (2006a, 2007)
SR	1.77	-0.53	300	Phenolic compounds (非フラボノイド系)	Airad-Rodriguez et al. (2011)
	2.40	0.63	405	アミノ酸、タンパク質と脂質酸化物による反応生成物、脂質酸化物	Kikugawa et al. (1985, 1987), Yamaki et al. (1992), Veberg et al. (2006a, 2007)

4-4 結論

フレーバータイプのチェダーチーズについて、蛍光指紋による熟成度指標値（遊離アミノ酸含量、遊離脂肪酸含量、タンパク質分解度、熟成期間）の推定モデル構築およびその精度を検証した。遊離アミノ酸含量、タンパク質分解度の指標値については高い精度で推定可能であることを明らかにした。熟成期間については、テストセットのデータを当てはめた際に上記2指標値に比較し精度が低下することが確認されたが、熟成期間のバランスが均等なサンプルの選定やサンプル数自体の増加により改善できるものと考えられた。

これら3つの熟成度指標値の推定モデルについては、第1潜在変数のローディング、VIP、SRの指標を探索することにより、アミノ酸類やタンパク質、アミノ酸と脂質酸化物による反応生成物やメイラード反応生成物、ポルフィリン類に該当する波長域が、共通して推定モデルの精度に寄与が大きいことが示唆された。

遊離脂肪酸含量については、推定モデルの精度が低かった。今回使用したフレーバーチェダーチーズの遊離脂肪酸含量にばらつきが大きかったこと、熟成期間の経過と共に遊離脂肪酸含量が顕著に増加する傾向がみられない品種であったことが要因と考えられた。

本章の研究により、第3章のノーマルタイプのチェダーに同じく、フレーバータイプのチェダーチーズについても、蛍光指紋による化学的熟成度指標値の推定が可能であることが明らかとなった。プロセスチーズで異なる役割を持つ両タイプのチーズで蛍光指紋の応用が可能であり、多品種に展開できる可能性を見出すことができた。

第5章 チェダーチーズ組織熟成度指標値の非接触の蛍光指紋測定による推定

5-1 序

第3章、第4章にて、ノーマルタイプおよびフレーバータイプのチェダーチーズを使用し、蛍光指紋がチーズの熟成度指標値である遊離アミノ酸、タンパク質分解度、熟成期間の推定に有効であることを確認した。次いで本章ではチーズ組織の物理的熟成度指標値に焦点を当て研究を行った。

機器計測によるチーズ組織の研究は幅広く詳細に行われており、また機器計測結果と官能評価による物性や組織の評価との関連性についても様々な研究がなされてきている(Lee, Imoto, & Rha, 1978; Drake, Gerard, Truong, & Daubert, 1999; Xiong, Meullenet, Hankins, & Chung, 2002; Foegeding, Brown, Drake, & Daubert, 2003; Guinee & Kilcawley, 2004; O'Callaghan & Guinee, 2004; Morita et al., 2015)。しかしながらプロセスチーズメーカーにおいて原料となるナチュラルチーズの評価に広く採用されている機器計測方法は少ない。なぜならば評価物の前処理や機器計測の条件が複雑であったり、機器計測結果を従来の官能評価結果に落とし込む方法が複雑であったり、評価するサンプル数が多いため、官能評価の方が素早く実施できたりするためである。そのため、個々のプロセスチーズメーカーは、従来の官能評価を継続する、もしくは機器計測のデータのみを直接採用するなど各社で独自の手法を適用している。例えば物性の官能評価として、ボディ値と呼ばれる指標が用いられている。ボディ値は訓練された評価者(グレーダー)がチーズを手指ですりつぶした時の感覚で物性的な熟成度合いを表す指標である。メーカー毎に異なる場合もあるが、10点が最もボディが強い組織(熟成の進んでいない若い組織)、1点が最もボディの弱い組織(熟成の進んだ組織)として表現される(Muir, 2010; 新説チーズ科学, 1989; 水野 & 市橋, 2007)。

チーズの組織、物性に関して推定を行ったものはいくつかあるが(Garimella Purna, Prow, & Metzger, 2005; Karoui & Dufour, 2006; Karoui, Mazerolles, & Dufour, 2003; Kulmyrzaev et al., 2005; Lebecque, Laguet, Devaux, & Dufour, 2001; Ozbekova & Kulmyrzaev, 2017)、それらは、1つまたは2つ程度の励起波長を使用して蛍光スペクトルを取得しており、主にその蛍光スペクトルのピーク強度と組成や組織の相関性を分析しているもの

である。

第3章および第4章より、従来の1つまたは2つ程度の励起波長を使用した蛍光測定よりも情報量の多い蛍光指紋が、チーズの遊離アミノ酸含量、タンパク質分解度、熟成日数といった複数の化学的熟成度指標値を推定するのに有効な手法であることが明らかとなった。しかしながら、これまでの測定方法は、蛍光分光光度計のセルに合わせてチーズサンプルをカットする前処理が必要であった。また、ボディ値のようにチーズ組織の熟成度指標値を蛍光指紋で推定するという試みはこれまで報告されていない。

そこで本章では、これまで蛍光指紋による推定の対象としてきた化学分析による熟成度指標値から、組織の官能評価であるボディ値へ、推定の対象を拡大することを試みた。更に蛍光分光光度計に光ファイバーユニットを使用することで、非接触で推定することを試みた。実用性を考慮した場合、非接触で蛍光指紋が測定できれば、セルに合わせてチーズをカットする従来の方法に比べチーズサンプルの前処理が不要となり、より迅速に測定できる方法としての活用が期待される。

5-2 材料および方法

【材料】

10個のオーストラリア産のボディタイプのチェダーチーズを使用した。時期を分けて3回の測定と評価を行い、合計30サンプル分の結果を得た。チーズサンプル取得後、1-2kgのブロックに小分けし、ガスバリア性を有するフィルムにてバキュームシールして保管した。ボディ値に差が出やすくなるよう、到着後の保管温度は-2°C、5°C、10°C、15°Cに分けた。測定のタイミングで同じチーズブロックから蛍光指紋測定用と化学分析用に分割し、それぞれの測定に使用した。化学分析用のチーズサンプルは、熟成が進行しないように蛍光指紋測定日より2日以内に粉碎して冷凍保存(-18°C)を行い、化学分析に供した。

【化学分析】

第3章と同様の方法にて、タンパク質分解度(水溶性窒素/全窒素)、遊離アミノ酸含量、遊離脂肪酸含量、pHの測定を行った。成分値の測定は、固形分値は直接乾燥法(ISO/IDF 4: 2004a)、脂肪は酸アンモニア分解法(ISO/IDF 5: 2004b)、タンパク質はデュ

マ法 (ISO/IDF 185: 2002) を用いて測定した。各サンプルで2回ずつ測定を行い、その平均値を採用した。

【ボディ値の評価】

ボディ値の評価は、5人の訓練されたグレーダーにより、5°Cに温度調整を行ったチーズサンプルを用いて行われた。10点が最も若く熟成の進んでいない組織、1点が最も熟成された組織という評価点とした。評価は5人の合議制により行った。ボディ値の評価と蛍光指紋の測定は、熟成度合いに差が出ないように、同日もしくは一両日中に実施した。

【蛍光指紋測定】

蛍光指紋の測定は、蛍光分光光度計 (F-7000, Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) と光ファイバーユニット (5J0-0114-F-7000, Hitachi High-Technologies) を使用した (Mita Mala et al., 2016)。チーズサンプルは測定前に20°Cに温度調整を行い、測定直前に3 cm × 3 cm × 6 cmの大きさにカットして、新鮮な表面を測定に供した。光ファイバーユニットの固定された台にチーズサンプルを置き、外部の光が入らないように囲いをして測定を行った (Fig. 5-1)。蛍光指紋の測定条件は、励起波長200–500 nm, 蛍光波長200–800 nm, 波長のインターバルは5 nmで実施した。モノクロメーターのスリット幅は励起側、蛍光側共に10 nmとし、ホトマル電圧は500V、スキャンスピードは60000 nm/min.とした。ファイバーユニットのプロブ先端とチーズサンプルとの距離は5 mmの間隔を空け、非接触の測定とした。それぞれのサンプルにて、3回の繰り返し測定を行った。

【熟成度指標値推定のPLS回帰モデル作成】

蛍光指紋の測定値から熟成度指標値を推定するために、PLS回帰モデルを作成した。第4章と同様の方法で蛍光指紋データの前処理を行い、散乱光やノイズの多い波長帯をカットした。残ったデータは3869条件の励起波長と蛍光波長の組み合わせであった。多変量解析には、MATLAB software (R2016a, MathWorks Inc., USA)とPLS Toolbox (version 8.1.1, Eigenvector Inc., USA)を使用した。

合計で90 (10種のサンプル×3回評価/サンプル×3度の評価時期)のボディ値の評価結

果遊離アミノ酸含量、タンパク質分解度（水溶性窒素／前窒素）と蛍光指紋のデータを用いて、PLS 回帰モデルの作成を行った。データの分割、および前処理は第 4 章と同様の方法を採用した。まず遊離アミノ酸含量とタンパク質分解度の熟成度指標について予測モデルを作成し、非接触測定の妥当性を確認した。その後、ボディ値の予測モデルを作成した。データ前処理の選定については、クロスバリデーションモデルの決定係数 (coefficient of determination of cross-validation : R^2CV) と平均平方二乗誤差 (root mean square error of cross-validation : $RMSECV$) にて、および予測モデルの正確性に関しては、テストセットデータの決定係数 (coefficient of determination of prediction : R^2P) と予測誤差 (root mean square error of prediction : $RMSEP$) で評価した。同時にそのモデルに対し、variable importance in projection (VIP) と selectivity ratio (SR) を計算し、モデルに寄与の高い波長域について考察した。波長域を選択するに当たっては、VIP は $VIP > 1$ 且つ上位 5%、SR は Farrés et al. (2015) より、 $SR > F$ 検定値 (95%) を寄与率が高い波長域の選択に採用した。更に、VIP は予測モデルにポジティブに寄与するのか、ネガティブに寄与するのか不明なので、回帰係数 (Regression Vector) を計算することにより確認した。

5-3 結果および考察

5-3-1 化学分析結果

全 10 サンプルの保管温度帯、成分値、熟成期間（製造後日数）、タンパク質分解度、遊離アミノ酸含量、遊離脂肪酸含量、pH の分析結果を Table 5-1 に示した。本研究に用いたチーズサンプル間で成分値、pH には大きな差は見られないことを確認した。

5-3-2 蛍光指紋測定結果および非接触測定の妥当性

ボディタイプチェダーチーズを非接触測定した蛍光指紋図を Fig. 5-2-(a) に示した。最も強度の強いピークは励起波長 290–305 nm、蛍光波長 320–350 nm の範囲に観察された。このピークはトリプトファンを含む芳香族アミノ酸のピークと判断した。他に励起波長 320 nm、蛍光波長 400 nm にも強度の高い波長域があり、こちらはビタミン A の波長と考えられた。いずれも第 3 章、第 4 章のチェダーチーズの蛍光指紋図と同様のピーク位置であった。励起波長 300 nm、発光波長 680 nm にもピークが観察されるが、モノクロメーターの光分散機構に起因する励起波長 300 nm、発光波長 335 nm の 2 次光であ

る（2次散乱光を生成するのと同じ機構）。

Fig. 5-2-(b)には同じチーズサンプルをセルに挿入する接触式で測定した蛍光指紋図を示した。主要なピークの位置や強度が同様であることが確認され、非接触測定においても、接触測定の場合と同様に測定が実施できていることを確認した。また、非接触測定で測定した蛍光指紋データにより、第3章、第4章で実施した化学分析の熟成度指標値の推定が可能か、遊離アミノ酸含量、タンパク質分解度にて確認した。トレーニングデータセットにて、最適な前処理および潜在変数を決定するために、各前処理でモデルを作成した結果をTable 5-2に示した。遊離アミノ酸含量ではnormalize + mean centerで潜在変数6の場合が、タンパク質分解度ではnormalize + autoscaleで潜在変数4の場合がR²CVの最も高い前処理であり、これらを採用した。それぞれの前処理を用いてトレーニングセットで予測モデルを作成し、テストセットのデータを当てはめて精度を確認した。作成した予測モデルをFig. 5-3に示した。テストセットのモデルでは、遊離アミノ酸含量でR²P = 0.909, RMSEP = 168.5 mg/100g、タンパク質分解度でR²P = 0.969, RMSEP = 1.40%であり、いずれも高い決定係数と小さい予測誤差であったことから、これらモデルは有効であることを確認した。以上のことから、非接触の蛍光指紋測定で得られたデータにおいても、これまでに行ってきた接触式の測定データと同様に推定モデルを作成が可能であることが示された。

5-3-3 ボディ値推定のためのPLS回帰モデルの作成

トレーニングデータセットにて、最適な前処理および潜在変数を決定するために、各前処理を行った後にクロスバリデーションモデルを作成した結果をTable 5-3に示した。今回作成したモデルでは潜在変数3でmean-centerとnormalize + mean-centerの前処理を行ったモデルが、共にR²CVが0.787、RMSECVが0.456であり、同等の精度を示した。

“Normalization”は輝度の合計が1になるように正規化する前処理である。この前処理はスペクトルの形状が同じでも、輝度の大きさが異なることに起因する差を減じることができる。本研究では、“normalization”を行うか否かで精度に違いが出なかったことから、そのような差が小さかった可能性がある。“autoscale”や“normalize + autoscale”の処理は精度が低かったため、採用はしなかった。

Figure 5-4-(a)（トレーニングセット）とFig. 5-4-(b)（テストセット）に、それぞれのデータセットにおける光ファイバー使用による蛍光指紋で推定したボディ値と実際

に評価されたボディ値の関係を示した。推定モデルは、mean center の前処理を用いて、潜在変数 3 で構築した。テストセットのモデルにて、強い相関 ($R^2P = 0.826$) と小さい推定誤差 ($RMSEP = 0.436$) であることを確認した。加えて、3 回繰り返し測定された蛍光指紋により推定されたボディ値の相対標準偏差は、最小値 0.21%、最大値 5.4%であった。全 30 サンプルの相対標準偏差の平均値は 1.6%であった。これらの数値により、本方法が 1-2%の差で繰り返し測定でき、再現性の高い方法であることが示された。

Fig. 5-3 の結果より、蛍光指紋がチーズのボディ値の推定に有効であること、また光ファイバーユニットによる非接触の測定でボディ値の測定が可能であることが示された。しかしながらグレーダーによるボディ値の測定結果にボディ値=6 付近の結果が多くなっており、測定データの分布が不均一である。このことが推定精度を下げる要因となっていると考えられた。ボディ値=6 付近の推定値はバラつきが多くなっているため、この付近の結果の取り扱いには注意が必要である。更に精度を向上させるためには、サンプル数を増やすこと、ボディ値の分布が均一になるようにサンプルを選定することが挙げられる。

5-3-4 PLS 回帰モデルに寄与の高い物質の推定

Fig. 5-4 に、PLS 回帰分析モデルに寄与する波長範囲の確認を行うために、VIP、SR スコアを等高線図で示した。VIP は、主に 2 つの VIP スコアの高い波長域が確認された (Fig. 5-5-(a))。1 以上の数値を示す VIP スコアはモデルにとって重要な領域であることを示す (Mehmood, Liland, Snipen, & Sæbø, 2012)。最も VIP スコアが高いのは励起波長 305 nm、蛍光波長 340 nm をピークとする波長域であり ($VIP = 69.9$)、次いで励起波長 340 nm、蛍光波長 400 nm の領域であった ($VIP = 15.9$)。励起波長 300 nm、蛍光波長 680 nm の波長域も VIP が高かったが、この波長域は励起波長 300 nm、蛍光波長 340 nm の波長域の 2 次光に当たる領域であるため、追及は行わなかった。励起波長 305 nm、蛍光波長 340 nm の領域については、これまでの報告にもある通り、トリプトファンおよび芳香族アミノ酸によるものと考えられた (Andersen, Vishart, & Holm, 2005; Andersen & Mortensen, 2008; Mazerolles et al., 2001)。

一方、SR スコアを等高線図で示したのが Fig. 5-5-(b) である。SR は回帰モデルにおける各変数の有用性について、数値による評価を提供する。SR スコアの低い波長域を除外し、SR スコアの高い波長域を選択することで、更に精度の高いモデルを構築でき

ることが期待される (Rajalahti et al., 2009)。本研究では、F 検定 (95%) の基準を寄与率が高い波長域の選択に採用した (Farrés et al., 2015)。F 検定 (95%) の SR スコアは 1.55 であった。このスコア (SR > 1.55) より大きい波長域は励起波長 335–445 nm、蛍光波長 370–520 nm の領域であった。この中で、ピーク波長は励起波長 385 nm、蛍光波長 460 nm であった。励起波長 385 nm、蛍光波長 460 nm における SR スコアは 7.11 であった。励起波長 350 nm、蛍光波長 770 nm の波長域も SR スコアが高かったが、この波長域は励起波長 340 nm、蛍光波長 400 nm の波長域の 2 次光に当たる領域であるため、更なる追及は行わなかった。

また VIP は正の値しかとらないため、ボディ値に対してポジティブに寄与するのか、ネガティブに寄与するのか不明である。そのため、VIP でピックアップされた波長域の推定モデルへの寄与の正負を確認するために回帰係数 (Regression Vector) を計算し、Fig. 5-5-(c) に示した。Fig. 5-5-(a) でピックアップした VIP のピークにおける回帰係数は、励起波長 305 nm、蛍光波長 340 nm ではポジティブ、励起波長 340 nm、蛍光波長 400 nm ではネガティブであった。これは、前者の波長域の蛍光強度がボディ値の低下と共に減少すること、また後者の波長域の蛍光強度がボディ値の低下に反して増加することを示唆している。

Fig. 5-6-(a) に、励起波長 340 nm におけるすべてのサンプルの蛍光スペクトルを示す。この蛍光波長 400 nm 付近のピークは、ボディ値が低くなるほど増加しており、ボディ値と励起波長 340 nm、蛍光波長 400 nm における蛍光の相関係数は、-0.77 であった。それぞれの蛍光物質の蛍光強度は、それらがチーズの熟成中にどのように代謝されるのかを表している。本研究でボディ値との相関が高かった励起波長 340 nm、蛍光波長 400 nm の波長域は、チーズの熟成が進むにつれて増加する物質であることが考えられた。この領域は第 3 章、第 4 章でもメイラード反応生成物の波長域として推定モデルの精度に寄与が高かった領域とほぼ合致し、ボディ値の推定モデルの精度についても同様に寄与が高いことが示唆された。

Fig. 5-6-(b) には、SR スコアが最も高かった励起波長 385 nm における蛍光スペクトルを示した。蛍光の極大波長は 500–550 nm の間にあるが、460 nm 付近にも複数のピークが確認された。460 nm 付近のピークは、ボディ値が弱くなるほど蛍光強度が増加しており、ボディ値と励起波長 385 nm、蛍光波長 460 nm における蛍光の相関係数は、-0.79 であった。この領域は第 4 章でも遊離アミノ酸、タンパク質分解度 (水溶性窒素/全窒

素)、熟成期間の推定モデルに貢献度が高かった領域とほぼ合致することから、脂質酸化物、およびアミノ酸、タンパク質と脂質酸化物による反応生成物であると考えられる。

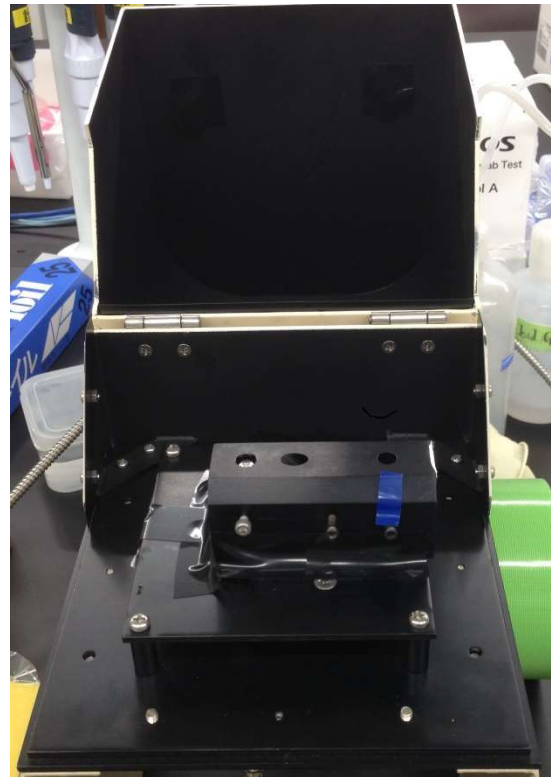
一方、リボフラビンの光酸化により生成するルミクロームも同領域に近いところに励起波長、蛍光波長のピークがあると報告されているが、そのピーク波長はモデルシステムで励起波長 360 nm、蛍光波長 450 nm (Fox & Thayer, 1998)、ヨーグルトで励起波長 370 nm、蛍光波長 430 nm (Christensen, Becker, & Frederiksen, 2005) である。波長の領域にずれがあり、ルミクロームによる関与は低いものとする。この波長域の差に追加して、リボフラビンの蛍光の変化が PLS 回帰モデルへの貢献度が低いことが、ルミクロームの貢献度が低いことを示唆している。もしルミクロームの蛍光の変化が PLS 回帰モデルの精度に高い関連性があるならば、リボフラビンもまた高い関連性を示すはずである。しかしながらリボフラビンに対応する蛍光の波長域は、PLS 回帰モデルへの貢献度が高いとは示されなかった。

Fig. 5-6-(c) は、VIP でピークを示した励起波長 305 nm の蛍光スペクトルを示している。蛍光波長 340 nm 付近のピークは、蛍光強度は大きく出ているが、ボディ値との相関については低く、ボディ値と励起波長 305 nm、蛍光波長 340 nm における蛍光の相関係数は 0.05 であった。このピーク波長に相当するトリプトファンおよび芳香族アミノ酸は、過去の研究においては、チーズを含めた乳製品のパラメーターの推定に使用されてきた (Andersen & Mortensen, 2008) が、本研究では相関係数が低く、PLS 回帰モデルへの寄与率が低い結果となった。この波長域は蛍光強度が強く、その変化を捉え易いが、蛍光指紋のような網羅的解析を行うことにより、チーズ熟成時の変化に対しては、更に相関が高く、PLS 回帰モデルの精度に寄与する波長域を見出すことができた為と考えられた。今後の研究においては、ボディ値の推移と高い相関を示すと考えられた物質を化学分析 (例えば、抽出および高速液体クロマトグラフィー法) により定量し、それらの物質とボディ値の変化を比較することで、実際に関与している物質を確定させることが可能と考える。

(a)



(b)



(c)

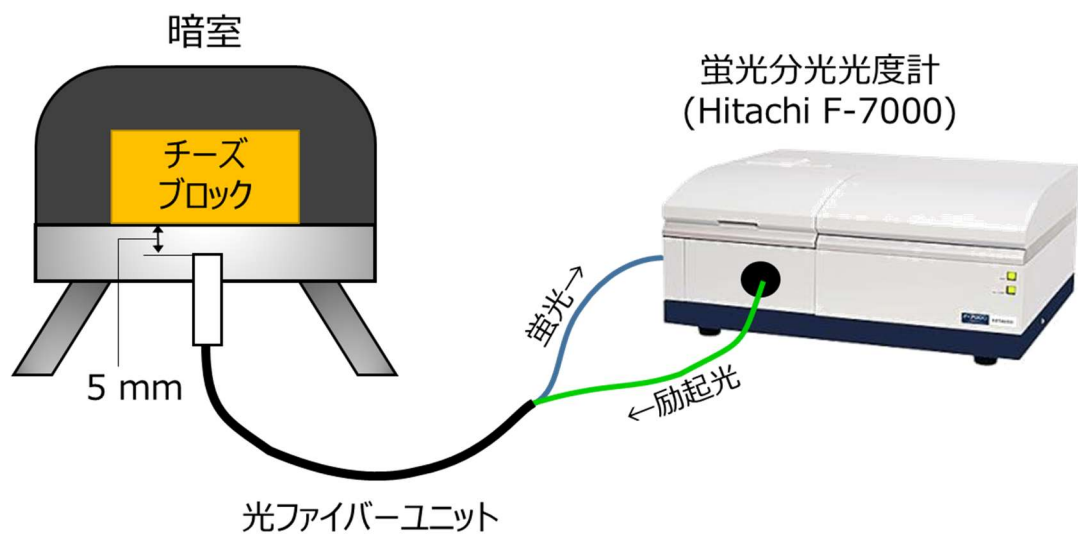


Fig. 5-1 Structure of FF measurement with fiber optics system.

(a) Appearance of the chamber, (b) Measurement stage,

(c) Overview of schematic structure

Table 5-1 Physico-chemical compositions of the 10 Cheddar cheeses.

Cheese samples	Age at measurements (d)			Storage temperature (°C)	pH	Dry matter (g/100g)	Fat (g/100g)	Protein (g/100g)	Salt (g/100g)
	1st	2nd	3rd						
1	231	269	318	-2	5.42	67.4	34.9	27.5	1.9
2	132	170	219	-2	5.40	67.3	34.7	27.4	2.0
3	111	149	198	-2	5.47	67.6	34.6	27.5	2.1
4	231	269	318	5	5.48	67.7	34.9	27.3	1.9
5	132	170	219	5	5.43	67.9	35.3	27.7	2.2
6	231	269	318	10	5.39	67.7	35.5	27.2	1.9
7	203	241	290	10	5.52	67.6	35.5	27.4	1.9
8	231	269	318	15	5.55	68.1	35.6	27.2	2.1
9	203	241	290	15	5.47	68.0	35.1	27.7	2.1
10	132	170	219	15	5.41	67.6	35.3	27.5	2.1

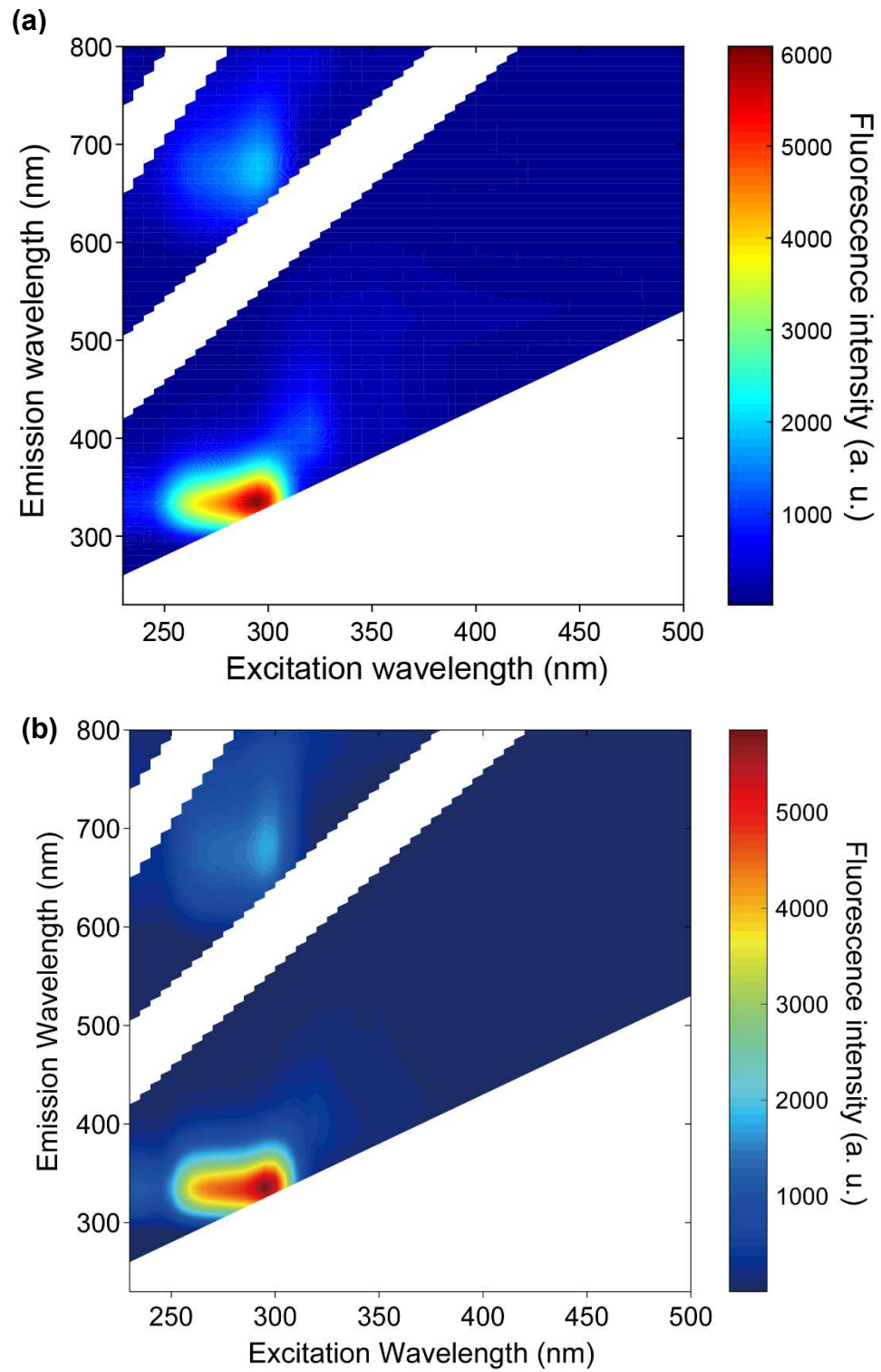


Fig. 5-2 Typical fluorescence fingerprint contour maps of body type cheddar cheese. (a) Non-contact measurement, (b) Contact measurement

Table 5–2 Results of PLS regression for four pretreatment methods. (Non-contact FF measurement) (a) Free amino acids, (b) Proteolysis index.

Abbreviations are; LVs: latent variables, RMSECV: root mean square error of cross-validation, R²CV: coefficient of determination of cross-validation, R²C: coefficient of determination of calibration (Training set), R²P: coefficient of determination of prediction (Test set), RMSEP: root mean square error of prediction (Test set).

(a)

Free amino acids

Pretreatment	LVs	RMSECV (mg/100g)	R ² CV	R ² C	R ² P	RMSEP (mg/100g)
Mean center	6	163.5	0.928	0.969	0.885	188.4
Normalize+mean center	6	149.8	0.939	0.977	0.909	168.5
Autoscale	6	210.2	0.881	0.979	0.883	192.3
Normalize+autoscale	6	181.3	0.913	0.981	0.921	156.7

(b)

Proteolysis index

Pretreatment	LVs	RMSECV (%)	R ² CV	R ² C	R ² P	RMSEP (%)
Mean center	4	1.78	0.946	0.958	0.969	1.48
Normalize+mean center	3	1.81	0.945	0.960	0.970	1.43
Autoscale	3	1.96	0.936	0.948	0.962	1.58
Normalize+autoscale	4	1.69	0.952	0.969	0.969	1.40

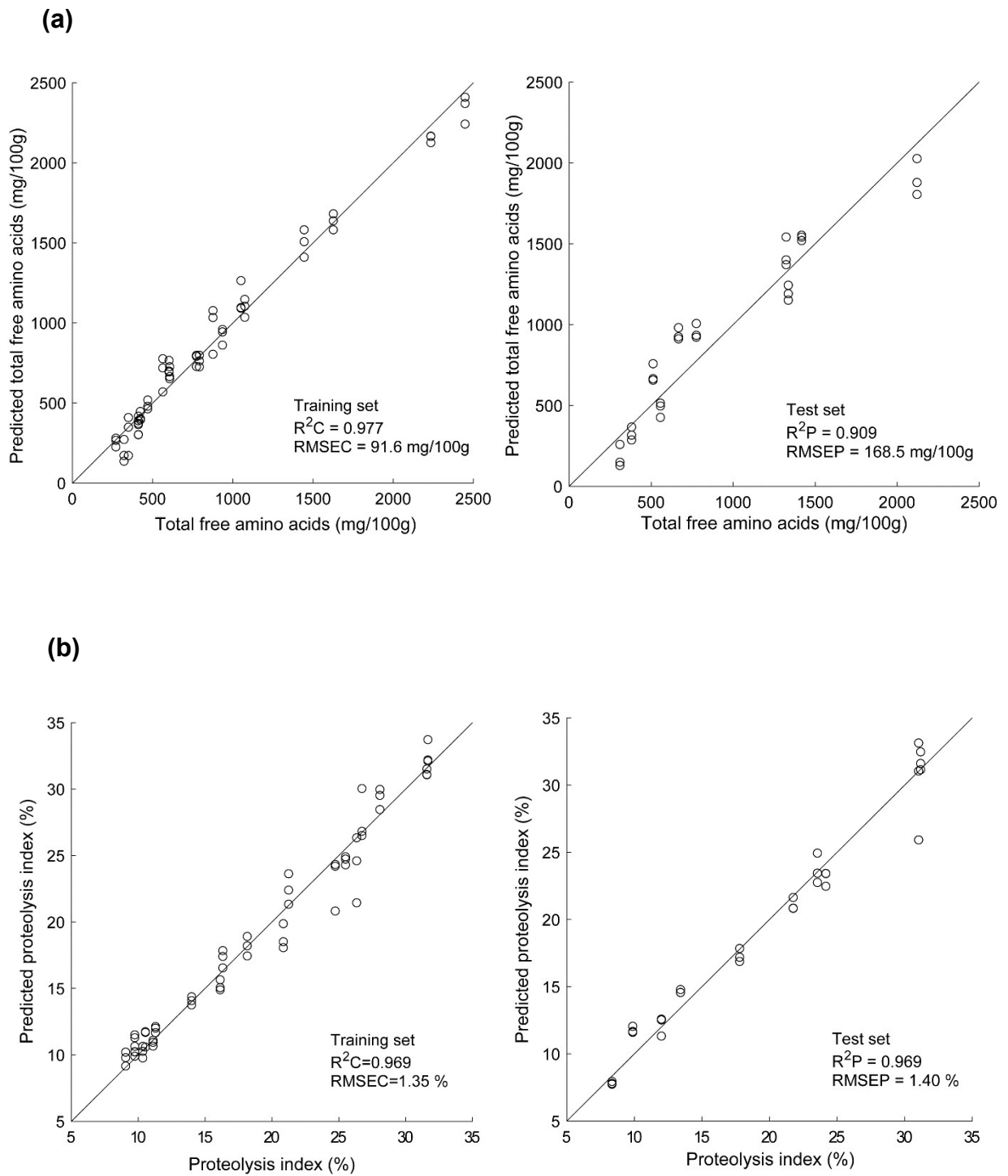


Fig. 5–3 Comparison between predicted value and measured value by FF measurement using optical fiber. (a) Free amino acids, (b) Proteolysis index

Table 5–3 Results of PLS regression for four pretreatment methods to predict body value.

Abbreviations are; LVs: latent variables, RMSECV: root mean square error of cross-validation, R^2_{CV} : coefficient of determination of cross-validation, R^2_C : coefficient of determination of calibration (Training set), R^2_P : coefficient of determination of prediction (Test set), RMSEP: root mean square error of prediction (Test set).

Pretreatment	LVs	RMSECV	R^2_{CV}	R^2_C	R^2_P	RMSEP
Mean center	3	0.456	0.787	0.800	0.826	0.436
Normalize + mean center	3	0.456	0.787	0.808	0.747	0.515
Autoscale	3	0.493	0.757	0.822	0.787	0.470
Normalize + autoscale	2	0.482	0.762	0.787	0.739	0.519

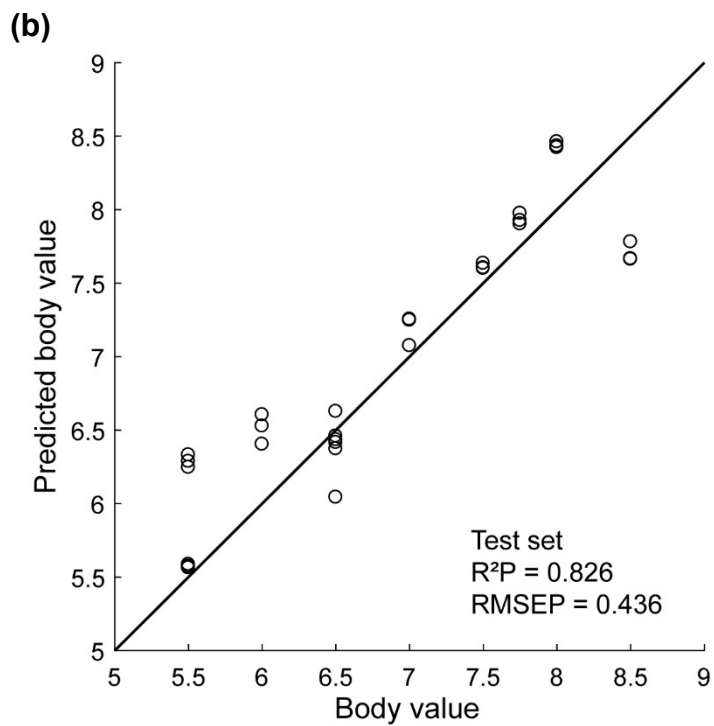
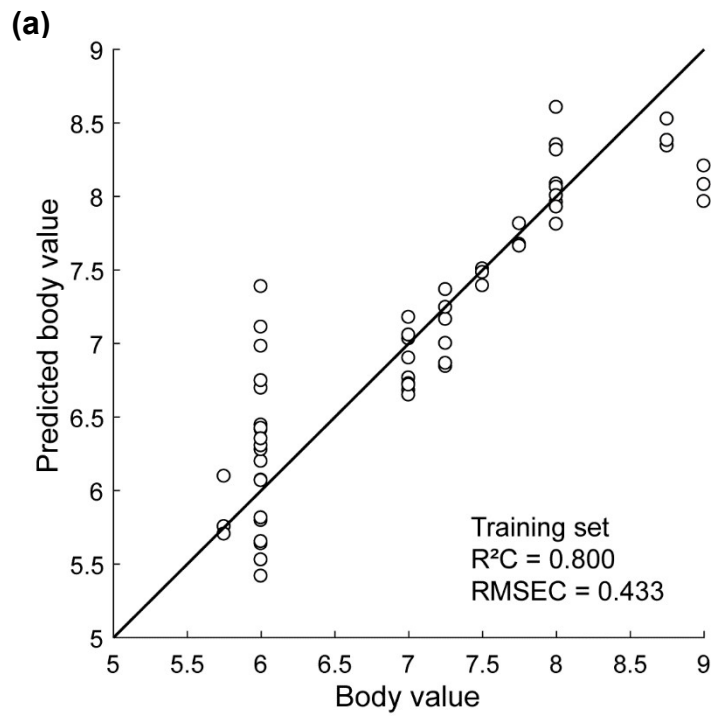


Fig. 5-4 Comparison between predicted value and evaluated value of body value. (a) Training set, (b) Test set

Fig. 5–5 Contour maps of each score in the PLS model of body value: (a) VIP, (b) SR, and (c) Regression vector.

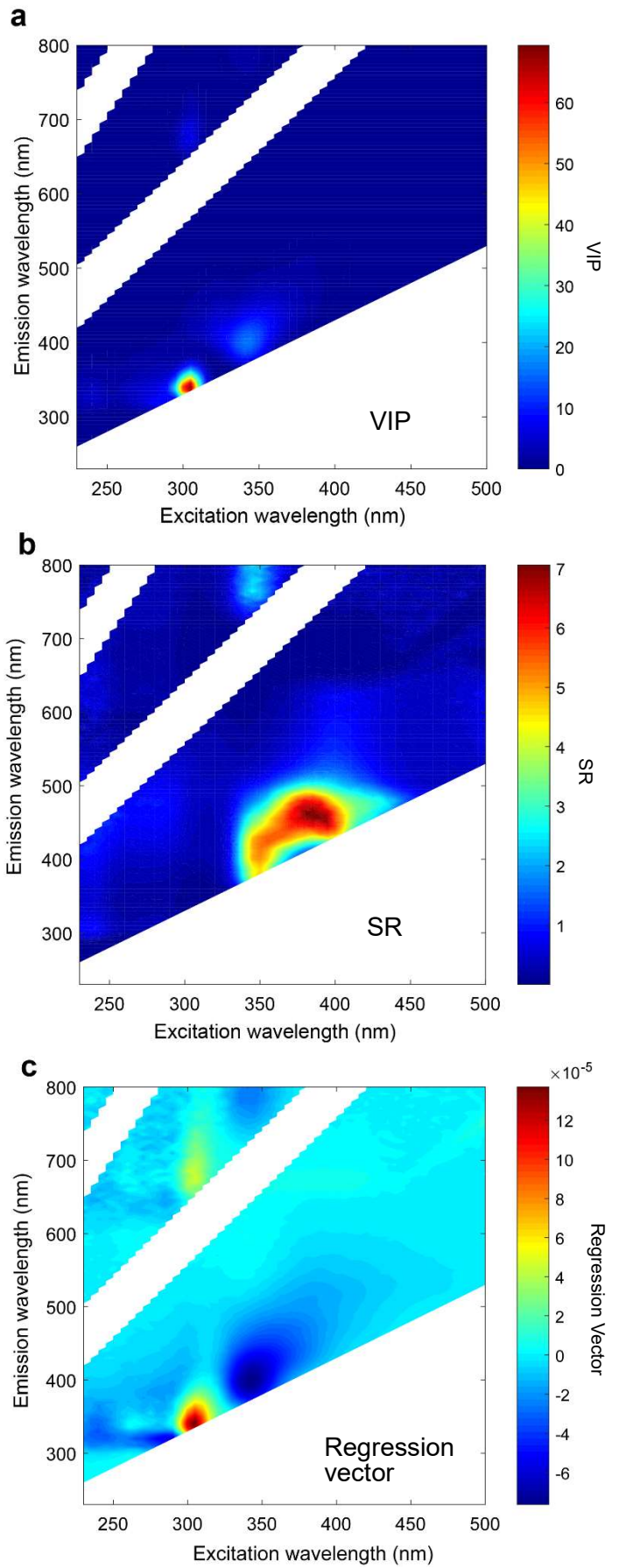
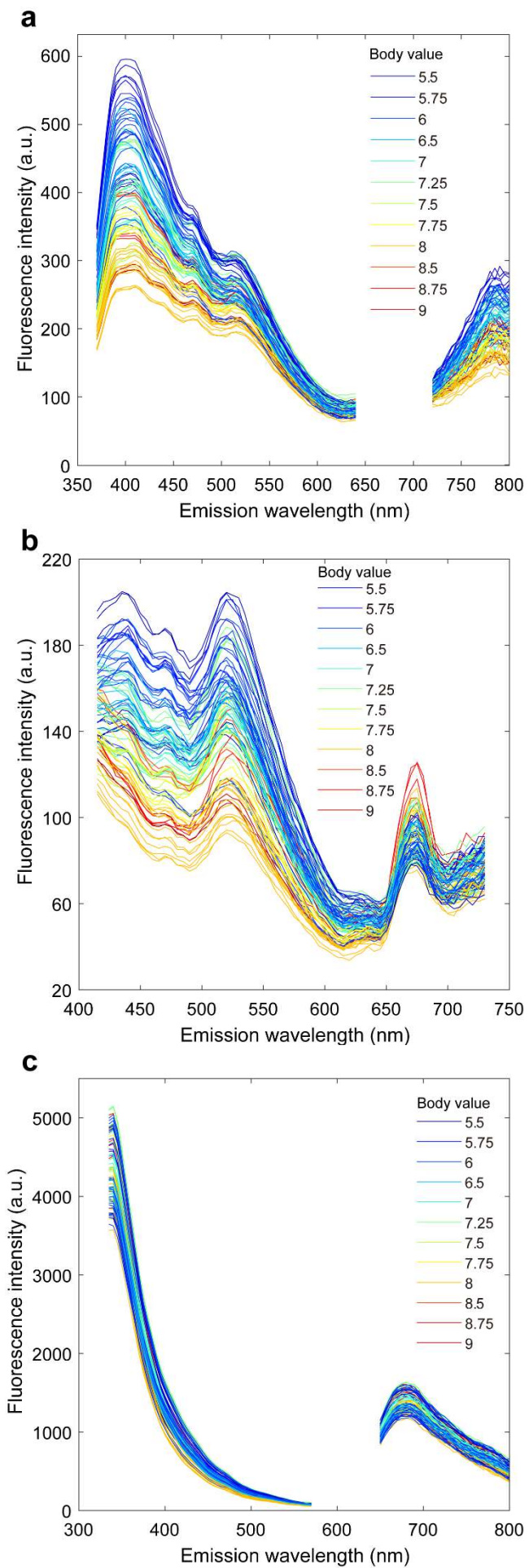


Fig. 5–6 Fluorescence emission spectra color coded by body value at excitation wavelength of (a) 340 nm, (b) 385 nm, and (c) 305 nm.



5-4 結論

本章では、光ファイバーを使用した非接触の蛍光指紋測定が、前章までに行っていた接触式測定と同様にチーズの熟成度指標値が推定可能であること、およびチェダーチーズの組織の物理的熟成度指標値であるボディ値の推定に有効であることを示した。これまでの接触式の蛍光測定と比較し、分光光度計のセルに合わせてサンプルを前処理する必要がなく、より実用的な方法とすることが可能となった。ボディ値を推定するテストモデルの推定精度は、強い相関 ($R^2P = 0.826$) と 小さな推定誤差 ($RMSEP = 0.436$) であった。更に、全 30 サンプルの 3 回繰り返し測定による相対標準偏差の平均は、1.6% であった。これらの値は、本方法が 1-2% の差で繰り返し測定でき、再現性の高い方法であることを示すものである。本研究では、非接触の蛍光指紋測定を導入しているが、得られた化学的指標値の推定モデルの精度は、従来の蛍光指紋の測定系による推定モデルと同等であった。ただし、ボディ値の推定では、ボディ値 6 付近の推定値のばらつきが大きくなっており、ボディ値の分布を均一にしたデータを使用するなどの改善が必要である。

第 3 章、第 4 章にあるチーズ熟成の指標値（熟成期間、タンパク質分解度、遊離アミノ酸含量）の推定において寄与が高いと見られていた脂質酸化物やメイラード反応生成物の波長域（励起波長 340 nm、蛍光波長 400 nm）も、今回のボディ値の推定モデルにて同様に寄与が高いことが明らかとなった。また SR スコアにより、PLS 回帰モデルにおいて第 4 章でも着目された脂質酸化物とアミノ酸、タンパク質の反応生成物や脂質酸化物の波長域が、推定モデルに寄与していると考えられた。これらの物質が推定モデルに寄与しているかを確認するためには、個々の物質の定量結果と蛍光指紋の測定結果とを比較するといった更なる研究が必要である。

本研究の結果により、チーズボディ値の推定を行うために開発された迅速で簡便な非接触の蛍光指紋測定が、プロセスチーズ製造の品質向上と安定を推進する実用的な方法に適することが示された。

第 6 章 蛍光指紋によるチーズ組織官能評価指標値の推定機構の考察

6-1 序

本論文第 5 章にて、チェダーチーズ組織の物理的熟成度指標値であるボディ値が、光ファイバースコープを用いた非接触の蛍光指紋測定により推定可能であること、またその推定モデルには、メイラード反応生成物、脂質酸化物やタンパク質、アミノ酸と脂質酸化物の反応生成物の蛍光波長域が、推定モデルへの寄与が高いことを明らかにした。本章では、開発した評価手法の原理的な裏付けを得ることを目的として、熟成に伴うチーズの構造変化や物理特性の変化を検討した。またボディ値の推定モデルに寄与が高いと示唆された物質がどのようにチーズボディ値の推定に関わっているか、そのメカニズムについて第 5 章のチェダーチーズにいくつかの追加の測定と観察を行い、考察を試みた。

6-2 材料および方法

【材料】

第 5 章のオーストラリア産チェダーチーズを用い、測定および評価のタイミングも第 5 章の蛍光指紋測定、ボディ値評価の時期に合わせた。

【化学分析】

第 4 章と同様の方法にて、ニンヒドリンポストカラム誘導体化法を用い、高速アミノ酸分析計 (L-8900; 株式会社 日立ハイテクノロジーズ) にて個々の遊離アミノ酸含量を測定した。

【ボディ値の評価】

第 5 章の評価結果を用いた。(方法は本論文 50 ページ参照)

【物性測定】

チェダーチーズの物性測定は、レオメーター（山電製 RHEONER-II シリーズ クリップメータ RE2-33005S）に、200N のロードセル、直径 30 mm 円板のプランジャーを使用した。チーズを直径 1.5 cm、高さ 1.5 cm の円柱状にカットし、測定の 4 時間前から 10°C に温度調整を行った。測定はレオメーターのステージを 1 mm/秒の速度で上昇させ、試料の 80% の高さまで圧縮し、破断強度、破断歪み率のデータを取得した。各サンプルについて 5 検体の測定を行い、その平均値を採用した。

【測定結果とボディ値の相関】

得られた測定結果とボディ値との相関について、Microsoft Excel 2013 を使用し、相関係数 (R) を算出した。

【SEM による微細構造観察】

チェダーチーズの微細構造は卓上走査型電子顕微鏡 (G2 pure, Phenom-World 製) を使用した。チーズを 5 mm×5 mm×20 mm の角柱状に切り出した後、その角柱を半分に割り、現れた断面を SEM の観察に供した。

6-3 結果および考察

6-3-1 遊離アミノ酸含量とボディ値の相関

Table 6-1 にチェダーチーズサンプルの遊離アミノ酸含量測定結果およびボディ値の評価結果を示した。また、Table 6-2 に得られた個々の遊離アミノ酸含量とボディ値について相関係数を算出した結果を示した。全ての遊離アミノ酸種がボディ値と負の相関をとり、ボディ値の低下と共に遊離アミノ酸含量が増加する傾向が確認された。グルタミンを除く個々の遊離アミノ酸種について、ボディ値と一定の相関があることを確認したが、総遊離アミノ酸含量の $R = -0.659$ よりも突出して相関の高い遊離アミノ酸種がないことを確認した。

6-3-2 SEM による構造観察

SEM によるチェダーチーズの組織観察結果を Fig. 6-1 に示した。高ボディ値のサン

ル、低ボディ値のチーズサンプルについてそれぞれ代表的なものを示した。高ボディ値サンプルは、白色のカゼインタンパク質が脂肪球を網目のように取り囲んでおり、そのカゼインタンパク質のネットワークは締りのある角張った網目状に観察された。一方の低ボディ値サンプルは、白色のカゼインタンパク質が膨潤したような状態が確認された。これはカゼインタンパク質が熟成の過程において、チーズ中の凝乳酵素、乳またはスターター乳酸菌、非スターター微生物由来により分解されたことで、カゼインタンパク質のネットワークが締りのある網目状から変化したものと考えられた。ナチュラルチーズの熟成に伴う組織の変化については、過去の報告においては、Everett & Auty (2008) により、チーズ熟成の構造上の特徴は、凝集した（カゼイン）ミセルの鎖から形成された繊維状カゼインマトリックスがより無定形の構造に変化することである、と述べられている。また近年の研究において Soodam ら (2017) は、チェダーチーズ組織の熟成に伴う構造変化を 3D 共焦点顕微鏡で観察し、カゼインタンパク質ネットワークにおける角頂部の数が、熟成期間が長くなるに伴い有意に減少すること、また脂肪については、脂肪球の分布、数およびその直径が熟成期間により影響を受けなかったことも報告している。本研究で使用了したチーズサンプルにおいても同様の現象が観察され、ボディ値がこれらカゼインタンパク質の熟成に伴う分解による構造変化を捉えていることが推察された。

6-3-3 物性測定値とボディ値の相関

Table 6-3-(a) に各チーズサンプルの物性測定結果を、また Table 6-3-(b) には、それら物性測定結果とボディ値との相関係数を示した。破断強度（相関係数=0.804）、破断歪み率（相関係数=0.668）共に高い相関をとることが確認された。破断強度が低下することは、組織が軟化していることを意味し、破断歪み率が低下することは組織の弾力性が低下し、もろくなることを意味する。すなわち、これら物性測定値とボディ値の相関の高さより、ボディ値はチーズ組織の硬さだけでなく、弾力性も捉えた指標であることが示唆された。

6-3-4 蛍光指紋によるボディ値推定のメカニズムの考察

前項までの結果により、官能評価であるボディ値は化学的、構造的な熟成の進行を反映した指標であると特徴付けることができ、それ故に第3章、第4章で確認した化学的

熟成度指標値と同様に、蛍光指紋による推定が可能となっていることが示唆された。本項ではこれらの結果を踏まえ、蛍光指紋によるボディ値の推定モデルに寄与の高い物質がどのように関与しているのか、メイラード反応生成物に着目してそのメカニズムについて考察した。

メイラード反応は、カルボニル炭素に対してアミノ基が求核反応を引き起こすことを起点とする化学反応であり、広い意味ではアミノカルボニル反応と同じことを示す。カルボニル化合物として、糖、糖の分解物、L-アスコルビン酸、ポリフェノール化合物、ステロイド化合物があり、アミノ化合物として、アミン、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、核酸塩基、アミノ脂質が挙げられる。食品ではその色や香りの形成に深く関わっており、高温に加熱する食品に焼き色や香りを付与するだけでなく、味噌や醤油の熟成のように温度の高くない食品でも着色や香りの形成に寄与している (臼井, 2015)。

メイラード反応の原料の一つであるアミノ化合物については、前項までの結果により、遊離アミノ酸が熟成に伴い増加することを確認している。もう一方の原料である糖 (乳糖) は生乳中に含まれる。ナチュラルチーズの製造工程において、その大部分がホエイと共に排除され、チーズカードに残る乳糖は 1 - 2% 程度である。残存した乳糖は乳酸菌による発酵で代謝され、チーズカードの pH を低下させる。そのため乳酸発酵を伴うナチュラルチーズにおいては、残存する乳糖含量はごく少量であることが知られている (現代チーズ学, 2008)。そのため、一般的なナチュラルチーズにおいてメイラード反応生成物が蓄積することは、これまであまり着目されていなかった。しかしながら、マンチェゴチーズ (Corzo, Villamiel, Arias, Jiménez-Pérez, & Morales, 2000)、チェダーチーズ、ゴータチーズやエメンタルチーズ (Schwietzke, Schwarzenbolz, & Henle, 2009)、ハルツァーチーズやゴータチーズ (Spanneberg, Salzwedel, & Glomb, 2012) といった報告にあるように、ナチュラルチーズの熟成過程でメイラード反応が進行することが示されている。これらの研究では、熟成の進んでいないチーズ、進んだチーズについて HPLC (high performance liquid chromatography) を用いてメイラード反応生成物の測定を行っている。メイラード反応生成物が熟成の進行に伴い増加することが示されており、ボディ値の推移との関連性が示唆される。また、ナチュラルチーズにおけるメイラード反応は、乳糖含量が限られているため、ボディ値との相関が高い遊離アミノ酸の増加が反応の進行を司るキードライバーとなっていることが推察される。

以上をまとめると、蛍光指紋によるボディ値推定モデルの推定メカニズムは以下のよう
に考えられる (Fig. 6-2)。

- ①チーズの熟成に伴い、カゼインタンパク質が分解され、遊離アミノ酸が増加する。
- ②チーズ中の残存乳糖と遊離のアミノ酸により、メイラード反応が進行する。
- ③メイラード反応の進行に伴い、自家蛍光を持つメイラード反応生成物が蓄積する。
- ④自家蛍光を持つメイラード反応生成物が、蛍光指紋により検出される。

アミノ酸においてもトリプトファン、フェニルアラニン、チロシンなど芳香族アミノ酸は
蛍光を発するが、チーズ熟成においては、アミノ酸はタンパク質を構成するか、タン
パク質が分解され遊離するかの状態は変わるものの総量は変わらないため、蛍光強度の
変化は起こりにくい。したがって、遊離アミノ酸が利用されるメイラード反応生成物の
ように新たに増加する物質の蛍光強度を捉えることにより、ボディ値の推定を可能にし
ていると考えられた。もちろん、ボディ値の推定モデルにはその他の物質の蛍光波長域
も寄与しているため、このメカニズムが一例であることを忘れてはならない。

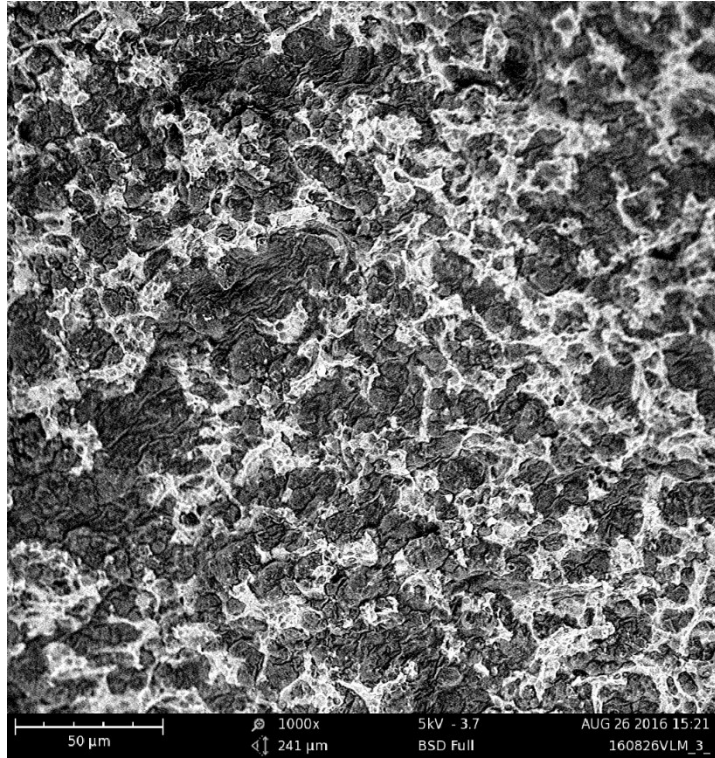
Table 6-1 Measurement result of free amino acid content and evaluation result of body value.

サンプルNo.	ボディ値	遊離アミノ酸含量 (mg/100g)																	合計			
		Asp	Thr	Ser	Asn	Glu	Gln	Gly	Ala	Val	Cys	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Trp	Lys		His	Arg	Pro
1	7.50	6.1	8.9	11.7	21.7	39.3	21.1	5.9	12.2	13.4	0.0	11.0	5.2	24.6	13.1	20.1	1.4	22.3	7.6	18.2	8.9	272.7
2	9.00	7.5	11.7	12.6	27.2	52.5	29.9	6.4	12.2	16.4	0.0	11.3	7.0	31.2	14.5	22.2	1.1	25.4	6.6	21.5	6.2	323.4
3	8.00	7.2	11.1	12.5	25.6	49.6	29.7	6.7	12.3	15.8	0.0	10.7	6.8	29.6	14.6	20.2	1.1	24.2	7.2	20.0	6.6	311.5
4	7.00	8.4	13.9	16.4	32.9	61.1	23.9	8.4	16.9	23.1	0.8	15.7	8.1	41.9	17.2	37.2	2.1	34.6	9.6	31.3	9.2	412.7
5	8.00	9.0	15.5	17.0	36.0	71.6	32.6	8.7	15.4	22.4	0.0	15.2	9.7	42.8	18.0	30.1	1.3	33.9	8.7	28.8	8.5	425.2
6	6.00	12.5	20.8	24.3	53.5	102.3	28.4	10.9	21.2	40.9	1.0	26.5	13.9	78.2	28.2	70.8	4.0	53.5	12.7	52.2	13.2	669.0
7	7.00	9.9	18.1	21.5	45.1	86.6	24.7	11.2	22.1	32.9	0.9	21.6	11.4	62.2	22.8	57.0	3.4	46.7	11.7	43.0	12.4	565.2
8	6.00	15.7	30.6	34.7	80.8	162.0	30.9	20.9	33.2	70.4	1.5	39.6	23.2	135.1	38.7	111.7	6.2	91.3	23.8	82.2	20.1	1052.6
9	5.50	24.3	42.4	48.4	122.4	235.8	53.9	24.8	35.2	77.2	1.2	45.6	35.0	168.5	44.4	117.2	5.0	111.0	24.0	99.4	22.5	1338.2
10	6.00	14.3	24.5	30.2	75.3	135.4	35.0	14.1	23.4	44.6	0.8	28.2	17.7	96.8	29.4	74.2	3.0	58.9	12.9	62.5	12.0	793.2
11	7.25	7.9	12.4	14.7	28.5	56.8	21.9	6.8	14.7	18.6	0.2	14.0	6.9	33.3	15.1	28.4	1.7	28.7	8.1	24.3	7.8	350.7
12	7.75	9.1	14.4	15.4	32.5	68.6	28.0	7.3	13.5	20.0	0.1	13.5	8.7	37.7	15.7	27.2	1.2	29.3	7.4	25.2	8.0	382.8
13	8.75	10.0	15.3	15.8	35.5	73.4	31.0	7.7	14.5	21.1	0.0	14.2	9.4	40.4	17.3	28.3	1.3	31.7	8.0	27.4	11.0	413.3
14	7.25	9.4	15.7	18.7	38.5	76.9	20.5	9.3	18.2	27.1	0.6	18.2	9.5	49.4	19.3	44.4	2.5	38.9	9.9	35.0	9.2	471.1
15	8.50	12.2	19.9	22.0	50.3	103.0	32.1	9.9	18.0	29.9	0.2	20.4	13.4	59.1	21.9	43.8	1.8	42.6	9.7	39.4	8.9	558.5
16	6.00	15.4	26.8	31.1	73.8	144.0	28.3	15.6	28.3	56.0	1.1	34.0	19.5	108.0	34.0	90.5	5.1	69.2	16.1	65.5	15.7	877.9
17	6.00	14.3	23.9	27.6	62.7	127.0	25.4	14.5	26.1	48.0	1.0	29.0	17.1	91.8	29.5	78.1	4.5	64.5	15.3	58.3	16.3	774.9
18	5.50	22.7	41.2	47.0	108.0	229.0	30.6	28.7	43.3	95.6	1.5	54.0	34.0	189.0	53.3	141.0	8.6	126.0	31.1	106.0	28.9	1419.5
19	5.75	29.8	51.3	59.3	141.0	300.0	47.2	30.3	42.1	95.5	1.0	56.3	44.6	208.0	53.7	136.0	6.4	142.0	29.8	128.0	26.2	1628.4
20	7.00	18.9	31.3	40.4	101.0	197.0	31.6	19.2	28.4	62.9	0.9	38.7	25.7	140.0	38.9	99.8	4.5	80.9	18.2	82.0	16.0	1076.3
21	7.50	9.9	17.5	19.7	40.8	75.0	38.4	8.4	18.0	28.6	0.2	18.2	11.3	53.8	23.0	46.2	2.4	46.3	10.2	35.3	10.4	513.7
22	8.00	12.2	20.7	21.4	49.0	96.9	49.5	9.5	18.2	32.6	0.0	19.5	15.3	64.4	25.6	49.8	2.0	55.0	11.0	42.7	12.5	607.9
23	8.00	12.8	20.6	21.5	49.0	96.9	51.7	9.7	18.2	31.8	0.0	19.8	15.5	63.8	26.0	49.0	2.1	52.7	11.7	41.5	9.6	604.0
24	7.00	12.1	24.4	26.7	57.4	116.0	40.8	12.4	25.1	46.5	0.5	26.6	16.9	91.0	32.3	78.0	4.0	75.0	15.8	58.2	17.8	777.5
25	7.75	16.8	30.3	31.1	78.1	156.0	58.2	13.2	24.3	53.2	0.2	29.9	25.0	108.0	35.1	85.0	3.1	84.9	15.9	70.1	18.7	937.1
26	6.00	22.5	44.0	44.9	114.0	227.0	57.9	21.3	39.6	95.0	0.6	51.4	39.1	187.0	57.5	141.0	7.4	135.0	24.3	110.0	26.9	1446.4
27	6.50	18.7	38.6	41.6	103.0	205.0	52.9	21.7	39.9	84.9	0.6	45.0	32.1	166.0	50.4	132.0	7.0	129.0	26.5	99.3	30.9	1325.1
28	6.00	32.6	64.5	70.5	158.0	357.0	60.9	41.8	62.0	154.0	0.6	81.8	66.2	296.0	85.8	197.0	12.3	246.0	50.8	156.0	42.5	2236.3
29	6.00	42.5	74.7	85.7	195.0	430.0	78.2	42.1	60.9	152.0	0.3	83.8	84.6	311.0	87.2	199.0	9.6	247.0	47.4	176.0	42.7	2449.7
30	6.50	35.0	62.9	70.8	174.0	364.0	70.6	31.5	50.3	137.0	0.2	71.4	71.5	276.0	78.2	185.0	8.1	202.0	35.3	165.0	34.1	2123.0

Table 6-2 Correlation coefficient between content of each free amino acid and body value.

遊離アミノ酸種	相関係数
Asp	-0.618
Thr	-0.637
Ser	-0.661
Asn	-0.664
Glu	-0.639
Gln	-0.271
Gly	-0.692
Ala	-0.708
Val	-0.670
Cys	-0.796
Met	-0.693
Ile	-0.564
Leu	-0.674
Tyr	-0.640
Phe	-0.730
Trp	-0.749
Lys	-0.609
His	-0.659
Arg	-0.684
Pro	-0.655
総遊離アミノ酸含量	-0.659

(a)



(b)

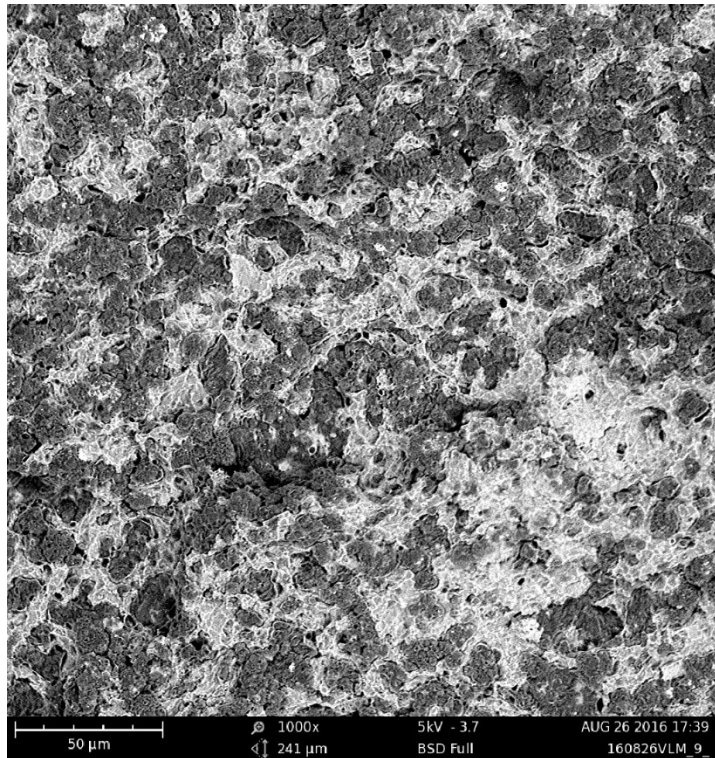


Fig. 6-1 Structural observation by SEM.

(a) Body value = 9 and (b) Body value = 5.5

Table 6-3 (a) Result of physical property measurement by texture analyzer,
 (b) Correlation coefficient between physical property value and body value.

The numbers of sample shows the same sample as Table 6-1.

(a)	サンプルNo.	破断強度 (N)	破断歪み率 (%)
	1	164.3	66.7
	2	167.3	61.4
	3	183.5	63.9
	4	159.8	69.7
	5	167.8	59.9
	6	113.3	53.7
	7	146.0	62.9
	8	99.9	48.8
	9	100.0	48.1
	10	93.9	50.1
	11	163.2	61.3
	12	165.4	60.9
	13	163.7	61.0
	14	139.7	62.0
	15	148.5	57.9
	16	110.7	53.9
	17	131.7	55.2
	18	85.6	44.1
	19	93.1	42.3
	20	79.1	41.7
	21	152.6	60.3
	22	147.3	59.0
	23	158.1	62.2
	24	132.7	61.7
	25	123.5	54.4
	26	101.3	46.0
	27	115.3	54.2
	28	89.3	37.9
	29	87.3	39.4
	30	80.4	39.8

(b)	破断強度 (N)	破断歪み率 (%)
相関係数	0.804	0.668

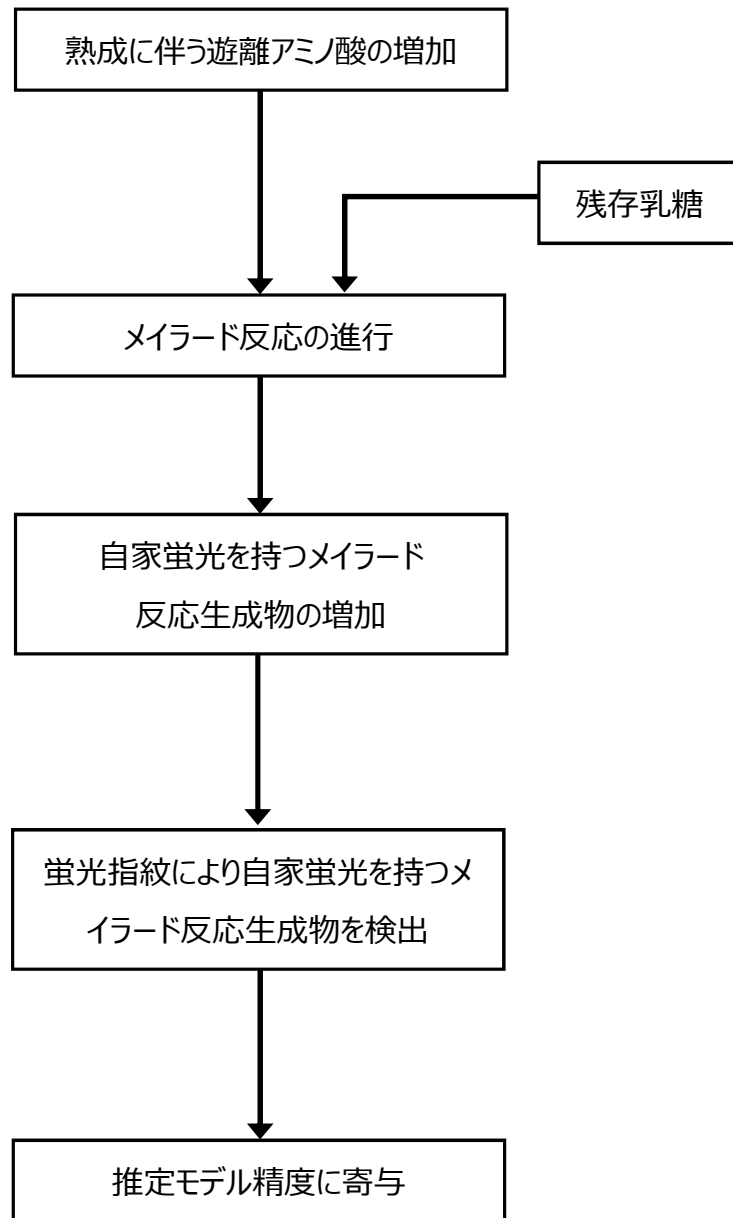


Fig. 6-2 Estimation mechanism by Maillard reaction products to body value prediction by fluorescent fingerprint.

6-4 結論

第5章にて推定の対象としたチーズ組織の官能評価指標であるボディ値について、遊離アミノ酸含量測定、SEMによる構造観察、レオメーターによる物性測定を行い、チーズ組織のどのような変化を捉えた指標であるか考察した。個々の遊離アミノ酸含量については、遊離アミノ酸総量のボディ値との $R = -0.659$ よりも突出して相関の高い遊離アミノ酸種はなく、総じて相関が高いことを確認した。SEMによる構造観察では、高ボディ値サンプルは、白色のカゼインタンパク質が脂肪球を網目のように取り囲んでおり、そのカゼインタンパク質のネットワークは締りのある角張った網目状に観察された。一方の低ボディ値サンプルは、白色のカゼインタンパク質が膨潤したような状態が確認された。これらの観察結果はチーズの熟成に伴う組織変化を観察した他の報告例と同じ事象であった。レオメーターによる物性測定では、ボディ値が破断強度、破断歪み率とも相関が高いことを明らかにした。すなわち、ボディ値はチーズ組織の硬さだけでなく、弾力性（もろさ）も捉えた指標であることが確認された。以上の結果をまとめると、第5章の研究で推定モデル構築の対象としたボディ値は、化学的、構造的な熟成の進行を反映した指標であると特徴付けることができた。

また、ボディ値推定モデル精度への寄与が高いメイラード反応生成物に着目して、ボディ値推定に関わるメカニズムを考察した。メイラード反応の進行条件とチーズ熟成時のメイラード反応の進捗に関する過去の報告を基に、以下のメカニズムが示唆された。

- ①チーズの熟成に伴い、カゼインタンパク質が分解され、遊離アミノ酸が増加
- ②チーズ中の残存乳糖と遊離のアミノ酸により、メイラード反応が進行
- ③メイラード反応の進行に伴い、自家蛍光を持つメイラード反応生成物が蓄積
- ④自家蛍光を持つメイラード反応生成物が、蛍光指紋により検出

詳細を確定させるためには、第5章および第6章で用いたチーズサンプルにて、メイラード反応生成物をHPLCにより定量し、その含量の変化とボディ値との相関を確認することが有効であるが、これには更なる研究が必要である。

第7章 総括

本研究の目的は、プロセスチーズ用原料ナチュラルチーズの熟成度指標値を迅速に把握するために、蛍光指紋と多変量解析を応用した新規手法を開発することである。プロセスチーズの製造において、日々使用される原料用ナチュラルチーズの熟成度指標値を把握するには、結果が出るまでに時間と手間を要する化学分析や、訓練された評価者を要する官能評価に頼っていた。しかし年々プロセスチーズの消費量が増加し、原料ナチュラルチーズの取扱量が増えていく状況や、労働人口の減少していく昨今の情勢を鑑みると、迅速かつ簡便に熟成度指標値を把握する新規手法を開発することが望まれている。

第1章では、日本におけるチーズ消費量の推移や、プロセスチーズ製造を取り巻く環境について概説し、プロセスチーズ原料用のナチュラルチーズの熟成度指標値を把握することの重要性について述べ、本研究の目的と方針をまとめた。

第2章では、プロセスチーズ用原料ナチュラルチーズの選定、ナチュラルチーズの熟成、現状のナチュラルチーズ熟成度指標値の評価、検査法、分光学的手法の乳業への応用、蛍光分光法の既往研究および蛍光指紋について、既往の手法、研究、取り巻く状況を概説し、本研究の意義を明確にした。

第3章では、まず基礎的検討として、ノーマルタイプのチェダーチーズを対象に、化学的熟成度指標値である遊離アミノ酸含量、タンパク質分解度（水溶性窒素／全窒素）、熟成期間について、蛍光指紋の測定による熟成度指標値の評価が可能であるか検討した。遊離アミノ酸含量、タンパク質分解度、熟成期間における推定モデルの決定係数 (R^2CV) は、それぞれ 0.90, 0.79, 0.93 であり、許容範囲内で推定可能であることを明らかにした。また推定モデルに寄与の高い波長域および物質として、脂質酸化物やメイラード反応生成物の関与が示唆された。

第4章では、フレーバータイプのチェダーチーズを対象に、第3章に続いて熟成度指標値である遊離アミノ酸含量、遊離脂肪酸含量、タンパク質分解度（水溶性窒素／全窒素）、熟成期間について、蛍光指紋測定および PLS 回帰分析を用いて予測モデルを作成し、タイプの異なるチェダーチーズへの応用可能性について更なる展開を図った。遊離アミノ酸含量、タンパク質分解度について、高い精度で推定可能であることを確認した。一方で熟成期間については、テストセットのデータを当てはめた際に精度が低下することが確認されたが、熟成期間の均等なサンプルの選定やサンプル数を増やすことにより

改善できるものと考えられた。遊離脂肪酸含量については、予測モデルの精度が低かった。使用したチェダーチーズの遊離脂肪酸含量にばらつきが大きかったこと、熟成期間の経過と共に遊離脂肪酸含量が顕著に増加する傾向がない品種であったことが要因と考えられた。熟成度指標値とみられている指標でも、チーズ品種により熟成期間の経過と共に変化する指標ではない場合があり、注意が必要であることを明らかにした。また遊離アミノ酸含量、遊離脂肪酸含量、タンパク質分解度（水溶性窒素／全窒素）、熟成期間の予測モデルに寄与が高い物質として、芳香族アミノ酸、ポルフィリン類、脂質酸化物やメイラード反応生成物、そして脂質酸化物とアミノ酸、タンパク質の反応生成物の関与が示唆された。

本章の研究により、第3章のノーマルタイプチェダーチーズと同様の化学的熟成度指標値（遊離アミノ酸含量、タンパク質分解度、熟成期間）で、蛍光指紋による評価が可能であり、用途の異なるチェダーチーズでも応用可能であることを明らかにした。

第5章では、ボディタイプのチェダーチーズを用い、化学的熟成度指標値から物理的熟成度指標値である組織の物性を表すボディ値に対象を拡大し、蛍光指紋によるボディ値評価の可能性について検討を行った。またより実用的な使用を考慮して、光ファイバースコープを用いた非接触測定を行い、その妥当性について併せて確認した。光ファイバースコープを用いた非接触の蛍光指紋測定により、遊離アミノ酸含量、タンパク質分解度（水溶性窒素／全窒素）の予測モデルにて、第4章の予測モデルと同様の精度を示し、非接触測定が妥当であることを確認した。蛍光分光光度計のセルに合わせてサンプルを前処理する必要がなく、より実用的な方法が使用可能となった。また、ノーマルタイプ、フレーバータイプのチェダーチーズと同様の熟成度指標値（遊離アミノ酸含量、タンパク質分解度）の推定が可能であることを確認し、チェダーチーズの用途によらず蛍光指紋による熟成度指標値の評価が可能であることを明らかにした。

ボディ値を推定するテストセットモデルの推定精度は、高い決定係数 ($R^2P = 0.826$) と小さな予測誤差 ($RMSEP = 0.436$) であった。更に、全30サンプルの3回繰り返し測定による相対標準偏差の平均は1.6%であった。これらの値により本方法が1-2%の差で繰り返し測定でき、再現性の高い方法であることが示された。ボディ値推定モデルへの寄与が高い物質として、脂質酸化物やメイラード反応生成物、そして脂質酸化物とアミノ酸、タンパク質の反応生成物の関与が示唆され、第3章、第4章の予測モデルに寄与の高い物質と共通した物質が関与していることを明らかにした。

第6章では、第5章で蛍光指紋による推定の対象とした物理的熟成度指標値のボディ値が、チーズ組織のどのような変化を捉えた指標なのか明らかにすると共に、ボディ値推定モデルに寄与が高いとされた物質がどのようにチーズボディ値の推定に関わっているか、メイラード反応生成物を例にとり、そのメカニズムについて考察した。個々の遊離アミノ酸含量については、遊離アミノ酸総量のボディ値との $R = -0.659$ よりも突出して相関の高い遊離アミノ酸種はなく、総じてボディ値との相関が高い（グルタミンを除く）ことを明らかにした。また SEM によりボディ値の異なるチーズサンプルの構造を観察し、ボディ値が低下することによる構造変化は熟成に伴うカゼインタンパク質の構造変化と同様であることを明らかにした。レオメーターによる物性測定により、ボディ値と破断強度、破断歪み率に相関が高いことを見出した。すなわち、ボディ値はチーズ組織の破断時の硬さだけでなく、弾力性（もろさ）も捉えた指標であることが示唆された。以上の要点からボディ値は、熟成に伴うカゼインタンパク質の分解とそれに伴うチーズ組織の構造変化を官能的に捉える指標であり、また化学的、構造的な熟成の進行を反映した指標であると特徴付けることができた。

以上の結果を踏まえ、ボディ値の予測モデルに寄与の高いとされたメイラード反応生成物を例に、蛍光指紋によりボディ値が推定されるメカニズムについて、メイラード反応の進行とチーズ熟成時のメイラード反応の進捗に関する過去の報告を基に、以下のように考察した。

- ①チーズの熟成に伴い、カゼインタンパク質が分解され、遊離アミノ酸が増加
- ②チーズ中の残存乳糖と遊離のアミノ酸により、メイラード反応が進行
- ③メイラード反応の進行に伴い、自家蛍光を持つメイラード反応生成物が蓄積
- ④自家蛍光を持つメイラード反応生成物が、蛍光指紋により検出

本研究により、蛍光指紋と多変量解析を用いた新規手法が、チェダーチーズの化学的、物理的熟成度指標値を迅速かつ簡便に評価する手法として有効であることを明らかとなった。これまで有効な迅速法が普及しなかった熟成度指標値の測定に関して、実用性を伴う方法を見出すことができた意義は大きいと考える。本研究で明らかとなった事は実用化に向けた検討の一部であり、今後迅速かつ簡便な手法として完成させていくには、以下の課題を検討していくことが必要である。

- ①熟成度指標値が均一に分散したチーズサンプルを増やして推定モデルを作成
- ②CHEDARチーズ以外のチーズ品種への応用性の確認
- ③寄与率の高い波長域のみの測定による更なる測定時間の短縮
- ④工場での実使用を想定した測定条件、装置形態の検討

蛍光指紋によるナチュラルチーズ熟成度指標値の推定が可能となることにより、これまで化学分析で数時間かけて結果を得ていた熟成度指標値が、5分程度で把握することができるようになり、大幅な検査時間の短縮が見込まれる。また評価者の育成や、評価者間の尺度合わせなど日々の訓練が必要であったボディ値のような官能評価指標値も、蛍光指紋の応用により推定が可能となれば、基準サンプルを再現性良く準備できることから、評価者の育成が促進され、また人材を選ばず結果を得ることが可能となり得る。これにより、より多くのサンプル数を検査確認することや、未だ検査時間を要する他の重要な検査に時間を充当することが可能となる。食品メーカーは日々可能な限りの製品検査を行い、食の安全、安心を消費者に届け続ける必要があり、迅速法による検査効率の改善が常に求められている。また、これまで分析の迅速化、簡便化が期待されていなかった指標や検査項目に関しても、本研究のように新規の評価手法が明らかになることにより、迅速法を検討する機運が高まるきっかけとなり得る。本研究で得られた成果が、検査、分析および評価技術、延いては乳業技術の更なる進展に貢献できることを期待する。

引用文献

- Airado-Rodríguez, D., Durán-Merás, I., Galeano-Díaz, T., & Wold, J. P. (2011). Front-face fluorescence spectroscopy: A new tool for control in the wine industry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(2), 257–264. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.10.005>
- Andersen, C. M., & Mortensen, G. (2008). Fluorescence Spectroscopy: A Rapid Tool for Analyzing Dairy Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 720–729. doi:10.1021/jf072025o
- Andersen, C. M., Vishart, M., & Holm, V. K. (2005). Application of Fluorescence Spectroscopy in the Evaluation of Light-Induced Oxidation in Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26), 9985–9992. doi:10.1021/jf051143d
- Birlouez-Aragon, I., Nicolas, M., Metais, A., Marchond, N., Grenier, J., & Calvo, D. (1998). A Rapid Fluorimetric Method to Estimate the Heat Treatment of Liquid Milk. *International Dairy Journal*, 8(9), 771–777. doi:[https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00119-8](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00119-8)
- Birlouez-Aragon, I., Sabat, P., & Gouti, N. (2002). A new method for discriminating milk heat treatment. *International Dairy Journal*, 12(1), 59–67. doi:[https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00131-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00131-5)
- Boubellouta, T., & Dufour, E. (2008). Effects of Mild Heating and Acidification on the Molecular Structure of Milk Components as Investigated by Synchronous Front-Face Fluorescence Spectroscopy Coupled with Parallel Factor Analysis. *Appl Spectrosc*, 62(5), 490–496. doi:10.1366/000370208784344406
- Cattaneo, T. M. P., & Holroyd, S. E. (2013). New Applications of near Infrared Spectroscopy on Dairy Products. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 21(5), 307–310. doi:10.1255/jnirs.1078
- Christensen, J., Nørgaard, L., Bro, R., & Engelsen, S. B. (2006). Multivariate Autofluorescence of Intact Food Systems. *Chemical Reviews*, 106(6), 1979–1994. doi:10.1021/cr050019q

- Christensen, J., Becker, E. M., & Frederiksen, C. S. (2005). Fluorescence spectroscopy and PARAFAC in the analysis of yogurt. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 75(2), 201–208. doi:10.1016/j.chemolab.2004.07.007
- Christensen, J., Povlsen, V. T., & Sørensen, J. (2003). Application of Fluorescence Spectroscopy and Chemometrics in the Evaluation of Processed Cheese During Storage. *Journal of Dairy Science*, 86(4), 1101–1107. doi:[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73692-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73692-3)
- Corzo, N., Villamiel, M., Arias, M. a., Jiménez-Pérez, S., & Morales, F. J. (2000). The Maillard reaction during the ripening of Manchego cheese. *Food Chemistry*, 71(2), 255–258. doi:[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00166-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00166-7)
- De Jong, C., & Badings, H. T. (1990). Determination of free fatty acids in milk and cheese procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis. *Journal of High Resolution Chromatography*, 13(2), 94–98. doi:doi:10.1002/jhrc.1240130204
- Dillard, C. J., & Tappel, A. L. (1971). Fluorescent products of lipid peroxidation of mitochondria and microsomes. *Lipids*, 6(10), 715–721. doi:10.1007/bf02531296
- Drake, M. A., Gerard, P. D., Truong, V. D., & Daubert, C. R. (1999). Relationship Between Instrumental and Sensory Measurements of Cheese Texture. *Journal of Texture Studies*, 30(4), 451–476. doi:10.1111/j.1745-4603.1999.tb00230.x
- Dufour, E. (2011). Recent advances in the analysis of dairy product quality using methods based on the interactions of light with matter. *International Journal of Dairy Technology*, 64(2), 153–165. doi:10.1111/j.1471-0307.2010.00665.x
- Dufour, E., & Riaublanc, A. (1997). Potentiality of spectroscopic methods for the characterisation of dairy products. I. Front-face fluorescence study of raw, heated and homogenised milks. *Le Lait*, 77(6), 657–670.
- Durek, J., Bolling, J. S., Knorr, D., Schwägele, F., & Schlüter, O. (2012). Effects of different storage conditions on quality related porphyrin fluorescence signatures of pork slices. *Meat Science*, 90(1), 252–258. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.07.010>
- Everett, D. W., & Auty, M. A. E. (2008). Cheese structure and current methods of analysis. *International Dairy Journal*, 18(7), 759–773. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.012>

- FAO. (2018). *Food Outlook* (1560–8182;Food Outlook). Retrieved from Rome, Italy:
- Farrés, M., Platikanov, S., Tsakovski, S., & Tauler, R. (2015). Comparison of the variable importance in projection (VIP) and of the selectivity ratio (SR) methods for variable selection and interpretation. *Journal of Chemometrics*, 29(10), 528–536. doi:10.1002/cem.2736
- Foegeding, E. A., Brown, J., Drake, M., & Daubert, C. R. (2003). Sensory and mechanical aspects of cheese texture. *International Dairy Journal*, 13(8), 585–591. doi:[https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00094-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00094-3)
- FOSS Japan 社ホームページ
URL: <https://www.fossanalytics.com/ja-jp#> (2018年11月1日確認)
- Fox, J. B., & Thayer, D. W. (1998). Radical oxidation of riboflavin. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 68(3), 174–180.
- 藤田かおり, 杉山純一, 蔦瑞樹, 小澤徹, 柴田真理朗, 吉村正俊, 粉川美踏, 久城真代 (2012) 蛍光指紋を利用したコムギ中のカビ毒の非破壊簡易検出法の開発. *農業情報研究*, 21(1), 11–19. doi:10.3173/air.21.11
- 藤田かおり, 蔦瑞樹, 杉山純一 (2008) 励起蛍光マトリクス計測を応用したデオキシニバレノールの新規判別法. *日本食品科学工学会誌*, 55(4), 177–182. doi:10.3136/nskkk.55.177
- 藤田かおり, 蔦瑞樹, 杉山純一, 久城真代, 柴田真理朗 (2011) 蛍光指紋による小麦粉中のデオキシニバレノールの非破壊計測. *日本食品科学工学会誌*, 58(8), 375–381. doi:10.3136/nskkk.58.375
- Fujita, K., Sugiyama, J., Tsuta, M., Shibata, M., Kokawa, M., Onda, H., & Sagawa, T. (2013). Detection of Aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in Nutmeg Extract Using Fluorescence Fingerprint. *Food Science and Technology Research*, 19(4), 539–545.
- Fujita, K., Tsuta, M., Kokawa, M., & Sugiyama, J. (2010). Detection of Deoxynivalenol Using Fluorescence Excitation–Emission Matrix. *Food and Bioprocess Technology*, 3(6), 922–927. doi:10.1007/s11947-010-0397-2
- Garimella Purna, S. K., Prow, L. A., & Metzger, L. E. (2005). Utilization of Front-Face Fluorescence Spectroscopy for Analysis of Process Cheese Functionality. *Journal of Dairy Science*, 88(2), 470–477. doi:[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72708-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72708-9)

- 現代チーズ学 (2008) (齊藤忠夫, 堂迫俊一, 井越敬司 編): 食品資材研究会.
- Guinee, T. P., Caric, M., & Kalab, M. (2004). Pasteurized processed cheese and substitute/imitation cheese products. In P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, & T. P. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (Vol. 2, pp. 349–394): Academic Press.
- Guinee, T. P., & Kilcawley, K. N. (2004). Cheese as an ingredient. In P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, & T. P. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (Vol. 2, pp. 395–428): Academic Press.
- Henry, R. C., Park, E. S., & Spiegelman, C. H. (1999). Comparing a new algorithm with the classic methods for estimating the number of factors. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 48(1), 91–97.
doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0169-7439\(99\)00015-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-7439(99)00015-5)
- Herbert, S., Riou, N. M., Devaux, M. F., Riaublanc, A., Bouchet, B., Gallant, D. J., & Dufour, E. (2000). Monitoring the identity and the structure of soft cheeses by fluorescence spectroscopy. *Le Lait*, 80, 621–634.
- 慶田雅洋 (1966) 赤外分光法による牛乳成分の測定 –牛乳の組成のコントロールの試み–. *化学と生物*, 4(6), 330–331. doi:10.1271/kagakutoseibutsu1962.4.330
- ISO/IDF. (2013) Milk and liquid milk products — Guidelines for the application of mid-infrared spectrometry, ISO 9622:2013 / IDF 141:2013
- ISO/IDF. (2006) Milk products — Guidelines for the application of near infrared spectrometry, ISO 21543:2006 / IDF 201:2006
- ISO/IDF. (2004a). Cheese and processed cheese: Determination of the total solids content (Reference method). 4:2004. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- ISO/IDF. (2004b). Cheese and processed cheese products: Determination of fat content: Gravimetric method (Reference method). 5:2004. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- ISO/IDF. (2002). Milk and milk products: Determination of nitrogen content: Routine method using combustion according to the Dumas principle. 185:2002. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.

- Kapoor, R., & Metzger, L. E. (2008). Process Cheese: Scientific and Technological Aspects—A Review. *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY*, 7(2), 194–214. doi:10.1111/j.1541-4337.2008.00040.x
- Karoui, R., & Blecker, C. (2011). Fluorescence Spectroscopy Measurement for Quality Assessment of Food Systems—a Review. *Food and Bioprocess Technology*, 4(3), 364–386. doi:10.1007/s11947-010-0370-0
- Karoui, R., & Dufour, E. (2006). Prediction of the rheology parameters of ripened semi-hard cheeses using fluorescence spectra in the UV and visible ranges recorded at a young stage. *International Dairy Journal*, 16(12), 1490–1497. doi:10.1016/j.idairyj.2005.07.010
- Karoui, R., Dufour, E., & De Baerdemaeker, J. (2006). Common components and specific weights analysis: A tool for monitoring the molecular structure of semi-hard cheese throughout ripening. *Analytica Chimica Acta*, 572(1), 125–133. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2006.04.089>
- Karoui, R., Mazerolles, G., & Dufour, E. (2003). Spectroscopic techniques coupled with chemometric tools for structure and texture determinations in dairy products. *International Dairy Journal*, 13(8), 607–620. doi:[https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00076-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00076-1)
- Kikugawa, K., & Beppu, M. (1987). Involvement of lipid oxidation products in the formation of fluorescent and cross-linked proteins. *Chemistry and physics of lipids*, 44(2–4), 277–296.
- Kikugawa, K., Takayanagi, K., & Watanabe, S. (1985). Polylysines Modified with Malonaldehyde, Hydroperoxylinoleic Acid and Monofunctional Aldehydes. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, 33(12), 5437–5444. doi:10.1248/cpb.33.5437
- Kokawa, M., Sugiyama, J., Tsuta, M., Yoshimura, M., Fujita, K., Shibata, M., Araki, T., Nabetani, H. (2013a). Development of a Quantitative Visualization Technique for Gluten in Dough Using Fluorescence Fingerprint Imaging. *Food and Bioprocess Technology*, 6(11), 3113–3123. doi:10.1007/s11947-012-0982-7

- Kokawa, M., Sugiyama, J., Tsuta, M., Yoshimura, M., Fujita, K., Shibata, M., Araki, T., Nabetani, H. (2013b). Fluorescence Fingerprint Imaging of Gluten and Starch in Wheat Flour Dough with Consideration of Total Constituent Ratio. *Food Science and Technology Research*, 19(6), 933–938. doi:10.3136/fstr.19.933
- Kokawa, M., Yokoya, N., Ashida, H., Sugiyama, J., Tsuta, M., Yoshimura, M., Fujita, K., Shibata, M. (2015). Visualization of Gluten, Starch, and Butter in Pie Pastry by Fluorescence Fingerprint Imaging. *Food and Bioprocess Technology*, 8(2), 409–419. doi:10.1007/s11947-014-1410-y
- 厚生労働省 乳及び乳製品の成分規格等に関する省令 (昭和 26 年厚生省令第 52 号)
平成 30 年 8 月 8 日公布 (平成 30 年厚生労働省令第 106 号) 改正
- Kuchroo, C. N., & Fox, P. F. (1982). Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft*, 37, 331–335.
- Kulmyrzaev, A., Dufour, E., Noël, Y., Hanafi, M., Karoui, R., Qannari, E. M., & Mazerolles, G. (2005). Investigation at the molecular level of soft cheese quality and ripening by infrared and fluorescence spectroscopies and chemometrics—relationships with rheology properties. *International Dairy Journal*, 15(6), 669–678. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.08.016>
- Kulmyrzaev, A. A., Karoui, R., De Baerdemaeker, J., & Dufour, E. (2007). Infrared and Fluorescence Spectroscopic Techniques for the Determination of Nutritional Constituents in Foods. *International Journal of Food Properties*, 10(2), 299–320. doi:10.1080/10942910601045305
- Lacotte, P., Gomez, F., Bardeau, F., Muller, S., Acharid, A., Quervel, X., Trossat, P., Birlouez-Aragon, I. (2015). Amaltheys: A fluorescence-based analyzer to assess cheese milk denatured whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 98(10), 6668–6677. doi:10.3168/jds.2015-9412
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*: Springer US.
- Lebecque, A., Laguet, A., Devaux, M. F., & Dufour, É. (2001). Delineation of the texture of Salers cheese by sensory analysis and physical methods. *Le Lait*, 81(5), 609–624.
- Lee, C.-H., Imoto, E. M., & Rha, C. (1978). Evaluation of Cheese Texture. *Journal of Food Science*, 43(5), 1600–1605. doi:10.1111/j.1365-2621.1978.tb02552.x

- Liu, Z., Sajith Babu, K., Coutouly, A., Allouche, F., & Amamcharla, J. K. (2016). Prediction of intact casein in cheese by using amalthays: A front-face fluorescence analyzer. *Journal of Animal Science*, 94(supplement5), 250–250. doi:10.2527/jam2016-0522
- Mazerolles, G., Devaux, M.-F., Duboz, G., Duployer, M.-H., Riou, N. M., & Dufour, E. (2001). Infrared and fluorescence spectroscopy for monitoring protein structure and interaction changes during cheese ripening. *Le Lait*, 81, 509–527.
- McSweeney, P. L. H. (2004). Biochemistry of Cheese Ripening: Introduction and Overview. In P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, & T. P. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (Vol. 1, pp. 347–360): Academic Press.
- Mehmood, T., Liland, K. H., Snipen, L., & Sæbø, S. (2012). A review of variable selection methods in Partial Least Squares Regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 118(Supplement C), 62–69. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2012.07.010>
- Mita Mala, D., Yoshimura, M., Kawasaki, S., Tsuta, M., Kokawa, M., Trivittayasil, V., Sugiyama, J., Kitamura, Y. (2016). Fiber optics fluorescence fingerprint measurement for aerobic plate count prediction on sliced beef surface. *LWT – Food Science and Technology*, 68, 14–20. doi:10.1016/j.lwt.2015.11.065
- 水野礼, 市橋信夫 (2007) プロセスチーズの物性に及ぼす原料用チェダーチーズの影響. *日本食品科学工学会誌*, 54(9), 395–400. doi:10.3136/nskkk.54.395
- Morales, F. J., Romero, C., & Jiménez-Pérez, S. (1996). Fluorescence associated with Maillard reaction in milk and milk-resembling systems. *Food Chemistry*, 57(3), 423–428. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00245-6](http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146(95)00245-6)
- Morales, F. J., & van Boekel, M. A. J. S. (1997). A study on advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: Fluorescence Accumulation. *International Dairy Journal*, 7(11), 675–683. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(97\)00071-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(97)00071-X)
- Morales, F. J., & van Boekel, M. A. J. S. (1998). A Study on Advanced Maillard Reaction in Heated Casein/Sugar Solutions: Colour Formation. *International Dairy Journal*, 8(10), 907–915. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00014-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00014-X)

- Morita, A., Araki, T., Ikegami, S., Okaue, M., Sumi, M., Ueda, R., & Sagara, Y. (2015). Coupled Stepwise PLS-VIP and ANN Modeling for Identifying and Ranking Aroma Components Contributing to the Palatability of Cheddar Cheese. *Food Science and Technology Research*, 21(2), 175–186. doi:10.3136/fstr.21.175
- Muir, D. D. (2010). The Grading and Sensory Profiling of Cheese. In B. A. Law & A. Y. Tamime (Eds.), *Technology of Cheesemaking* (pp. 440–474): Wiley–Blackwell.
- 中村結花子, 藤田かおり, 杉山純一, 蔦瑞樹, 柴田真理朗, 吉村正俊, 粉川美踏, 鍋谷浩志, 荒木徹也 (2012) 蛍光指紋計測によるマンゴーの産地判別. *日本食品科学工学会誌*, 59(8), 387–393. doi:10.3136/nskkk.59.387
- 中村結花子, 藤田かおり, 蔦瑞樹, 杉山純一, 粉川美踏, 吉村正俊, 柴田真理朗, 鍋谷浩志, 荒木徹也, 中村哲 (2013) 蛍光指紋によるサトイモの産地判別法開発. *日本食品工学会誌*, 14(3), 125–129. doi:10.11301/jsfe.14.125
- Nawrocka, A., & Lamorska, J. (2013). Determination of Food Quality by Using Spectroscopic Methods. In S. Grundas & A. Stepniewski (Eds.), *Advances in Agrophysical Research* (pp. Ch. 14): InTech.
- Nishino, K., Nakamura, K., Tsuta, M., Yoshimura, M., Sugiyama, J., & Nakauchi, S. (2013). Optimization of excitation–emission band-pass filter for visualization of viable bacteria distribution on the surface of pork meat. *Optics Express*, 21(10), 12579–12591. doi:10.1364/OE.21.012579
- 農林水産省 「チーズの需給表」平成 29 年度チーズの需給表
平成 30 年 7 月 13 日公表
URL: http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/cheese_zyukyu/
(2018 年 11 月 1 日確認)
- 大下誠一, 白井宏明 (2014) 農産物・食品の安全と品質の確保技術 (第 4 回) —食肉表面の清浄度非破壊検出—. *農業食料工学会誌*, 76(2), 138–142. doi:10.11357/jsamfe.76.2_138
- O'Callaghan, D. J., & Guinee, T. P. (2004). Rheology and Texture of Cheese. In P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, & T. P. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (Vol. 1, pp. 511–540): Academic Press.

- Oto, N., Oshita, S., Makino, Y., Kawagoe, Y., Sugiyama, J., & Yoshimura, M. (2013). Non-destructive evaluation of ATP content and plate count on pork meat surface by fluorescence spectroscopy. *Meat Science*, 93(3), 579–585. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.010>
- Ozbekova, Z., & Kulmyrzaev, A. (2017). Fluorescence spectroscopy as a non destructive method to predict rheological characteristics of Tilsit cheese. *Journal of Food Engineering*, 210, 42–49. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.04.023>
- Piska, I., & Štětina, J. (2004). Influence of cheese ripening and rate of cooling of the processed cheese mixture on rheological properties of processed cheese. *Journal of Food Engineering*, 61(4), 551–555. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00217-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00217-6)
- Purna, S. K. G., Pollard, A., & Metzger, L. E. (2006). Effect of Formulation and Manufacturing Parameters on Process Cheese Food Functionality—I. Trisodium Citrate. *Journal of Dairy Science*, 89(7), 2386–2396. doi:[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72311-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72311-6)
- Rajalahti, T., Arneberg, R., Berven, F. S., Myhr, K.-M., Ulvik, R. J., & Kvalheim, O. M. (2009). Biomarker discovery in mass spectral profiles by means of selectivity ratio plot. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 95(1), 35–48. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2008.08.004>
- Sádecká, J., & Tóthová, J. (2007). Fluorescence spectroscopy and chemometrics in the food classification—a review. *Czech Journal of Food Sciences*, 25(4), 159–173.
- 佐藤哲生, 岩元睦夫, 橋詰和宗, 吉野正純, 古川左近, 染谷幸雄, 矢野信禮 (1985) 近赤外分光分析法による生乳成分の測定. *日本畜産学会報*, 56(11), 878–882. doi:10.2508/chikusan.56.878
- Saranwong, S., & Kawano, S. (2008). System Design for Non-Destructive near Infrared Analyses of Chemical Components and Total Aerobic Bacteria Count of Raw Milk. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 16(4), 389–398. doi:10.1255/jnirs.807
- Schamberger, G. P., & Labuza, T. P. (2006). Evaluation of Front-face Fluorescence for Assessing Thermal Processing of Milk. *Journal of Food Science*, 71(2), C69–C74. doi:doi:10.1111/j.1365-2621.2006.tb08884.x

- Schwietzke, U., Schwarzenbolz, U., & Henle, T. (2009). Influence of Cheese Type and Maturation Time on the Early Maillard Reaction in Cheese. *Czech Journal of Food Sciences*, 27, S140–S142.
- Shibata, M., Fujita, K., Sugiyama, J., Tsuta, M., Kokawa, M., Mori, Y., & Sakabe, H. (2011). Predicting the Buckwheat Flour Ratio for Commercial Dried Buckwheat Noodles Based on the Fluorescence Fingerprint. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(7), 1312–1316. doi:10.1271/bbb.110091
- 新説チーズ科学 (1989) (中澤勇二、細野明義 編): 食品資材研究会.
- Shirai, H., Oshita, S., Makino, Y., Sugiyama, J., & Yoshimura, M. (2014). Nondestructive Hygiene Monitoring on Pork Meat Surface Using Excitation–Emission Matrices with Two-Dimensional Savitzky–Golay Second-Order Differentiation. *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), 3455–3465. doi:10.1007/s11947-014-1353-3
- Soodam, K., Ong, L., Powell, I. B., Kentish, S. E., & Gras, S. L. (2017). Effect of elevated temperature on the microstructure of full fat Cheddar cheese during ripening. *Food Structure*, 14, 8–16. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foostr.2017.05.003>
- Spanneberg, R., Salzwedel, G., & Glomb, M. A. (2012). Formation of Early and Advanced Maillard Reaction Products Correlates to the Ripening of Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(2), 600–607. doi:10.1021/jf204079f
- 杉山純一 (2014) 農産物・食品の安全と品質の確保技術 (第5回) —蛍光指紋による食品の判別・定量・可視化技術—. *農業食料工学会誌*, 76(3), 232–237. doi:10.11357/jsamfe.76.3_232
- 杉山純一, 蔦瑞樹 (2013) 蛍光指紋による食品の判別・定量技術. *日本食品科学工学会誌*, 60(9), 457–465. doi:10.3136/nskkk.60.457
- 杉山武裕, 藤田かおり, 蔦瑞樹, 杉山純一, 柴田真理朗, 粉川美踏, 荒木徹也, 鍋谷浩志, 相良泰行 (2010) 励起蛍光マトリクスによるそば粉と小麦粉の混合割合の推定. *日本食品科学工学会誌*, 57(6), 238–242. doi:10.3136/nskkk.57.238
- Stapelfeldt, H., & Skibsted, L. H. (1994). Modification of β -lactoglobulin by aliphatic aldehydes in aqueous solution. *Journal of Dairy Research*, 61(2), 209–219. doi:10.1017/S0022029900028223

- Tamime, A. Y. (2011). *Processed Cheese and Analogues* (Vol. 16): John Wiley & Sons.
- Tsenkova, R., Atanassova, S., Itoh, K., Ozaki, Y., & Toyoda, K. (2000). Near infrared spectroscopy for biomonitring: Cow milk composition measurement in a special region from 1,100 to 2,400 nanometers. *Journal of Animal Science*, 78(3), 515–522.
- Tsenkova, R., Atanassova, S., Toyoda, K., Ozaki, Y., Itoh, K., & Fearn, T. (1999). Near-Infrared Spectroscopy for Dairy Management: Measurement of Unhomogenized Milk Composition. *Journal of Dairy Science*, 82(11), 2344–2351. doi:[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75484-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75484-6)
- 蔦瑞樹, 杉山純一 (2015) 蛍光指紋による食品の品質評価技術とその応用. *化学と生物*, 53(5), 285–292. doi:10.1271/kagakutoseibutsu.53.285
- 臼井照幸 (2015) 食品におけるメイラード反応. *日本食生活学会誌*, 26(1), 7–10. doi:10.2740/jisdh.26.7
- Veberg, A., Olsen, E., Nilsen, A. N., & Wold, J. P. (2007). Front-face fluorescence measurement of photosensitizers and lipid oxidation products during the photooxidation of butter. *Journal of Dairy Science*, 90(5), 2189–2199. doi:10.3168/jds.2006-405
- Veberg, A., Sørheim, O., Moan, J., Iani, V., Juzenas, P., Nilsen, A. N., & Wold, J. P. (2006a). Measurement of lipid oxidation and porphyrins in high oxygen modified atmosphere and vacuum-packed minced turkey and pork meat by fluorescence spectra and images. *Meat Science*, 73(3), 511–520. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.02.001>
- Veberg, A., Vogt, G., & Wold, J. P. (2006b). Fluorescence in aldehyde model systems related to lipid oxidation. *LWT – Food Science and Technology*, 39(5), 562–570. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2005.03.009>
- Wold, J. P., Veberg, A., Nilsen, A., Iani, V., Juzenas, P., & Moan, J. (2005). The role of naturally occurring chlorophyll and porphyrins in light-induced oxidation of dairy products. A study based on fluorescence spectroscopy and sensory analysis. *International Dairy Journal*, 15(4), 343–353. doi:10.1016/j.idairyj.2004.08.009
- Wolfgang, B., Henning, K., Karl, M., & Uhlmann, G. (2002). *Processed cheese manufacture : a JOHA guide* (H. Gillan, Trans. K. Henning Ed.): BK Giulini Chemie GmbH & Co. OHG, Landenburg

- Xiong, R., Meullenet, J. F., Hankins, J. A., & Chung, W. K. (2002). Relationship between Sensory and Instrumental Hardness of Commercial Cheeses. *Journal of Food Science*, 67(2), 877–883. doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb10693.x
- Yamaki, S., Kato, T., & Kikugawa, K. (1992). Characteristics of fluorescence formed by the reaction of proteins with unsaturated aldehydes, possible degradation products of lipid radicals. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 40(8), 2138–2142.
- Yoshimura, M., Sugiyama, J., Tsuta, M., Fujita, K., Shibata, M., Kokawa, M., Oshita, S., Oto, N. (2014). Prediction of Aerobic Plate Count on Beef Surface Using Fluorescence Fingerprint. *Food and Bioprocess Technology*, 7(5), 1496–1504. doi:10.1007/s11947-013-1167-8
- Zehren, V. L., & Nusbaum, D. D. (1992). *Process cheese*: Schreiber Foods, Green Bay, Wisconsin, USA.

謝辞

本博士論文は国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門食品安全領域長、筑波大学連携大学院教授 等々力 節子 博士の研究指導ならびに、筑波大学大学院 生命環境系教授 中嶋 光敏 博士、同教授 北村 豊 博士、同助教 源川 拓磨 博士の副指導のもとに作成されたものであります。先生方の多大なるご指導、ご鞭撻に心より感謝の意を表します。

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門上級研究員 蔦 瑞樹 博士、筑波大学大学院 生命環境系助教 粉川 美踏 博士には、共同研究開始時から入学後の研究内容、学会発表や論文執筆に至るまで、常に適切なアドバイスと的確なフォローをいただきました。心より感謝申し上げます。

本研究の実験の大部分は国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門 計測情報工学ユニットの設備を使用して行われました。同ユニットの皆様には設備の利用に際し多大なるご協力をいただきました。心より御礼申し上げます。

共同研究実施時よりご指導いただき、博士課程への入学につきましてご支援いただきました、元国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門主席研究員、一般社団法人米ゲル技術研究所所長 杉山 純一 博士に御礼申し上げます。

本研究に深いご理解と全面的なご援助を与えてくださいました森永乳業株式会社 宮原 道夫 代表取締役社長、大川 禎一郎 専務取締役研究本部長、池田 三知男 マーケティング統括部長、小石原 洋 フードソリューション研究所長、宮地 一裕 食品開発研究所長に深く感謝申し上げます。開発業務に携わりながら研究を遂行するにあたり、同社 食品開発研究所 チーズグループ 阿部 忠博 グループリーダー、水野 礼 マネージャー、同社 マーケティング統括部 白庄司 宣明 マネージャーならびに食品開発研究所 チーズグループの皆様には、本研究に対するご理解と多大なるご協力をいただきました。謹んで感謝の意を表します。

最後に、本研究を進めるにあたりお世話になりながらお名前を記すことのできなかった皆様と、本研究の遂行を支えてくれた家族に心から感謝いたします。

2019年1月 千葉 啓