

近赤外分光法による生育肥大中及び成熟ナシ果実の糖度測定

誌名	佐賀大学農学部彙報
ISSN	05812801
巻/号	77
掲載ページ	p. 1-10
発行年月	1994年9月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



近赤外分光法による生育肥大中及び成熟ナシ果実の糖度測定

小島孝之・井上 康*・田中宗浩**

(施設農業生産学)

平成6年6月17日受理

Measurement of Brix Value in Various Developing Stages of Japanese Pear by NIR Spectroscopy

Takayuki KOJIMA, Yasushi INOUE* and Munehiro TANAKA**

(Laboratory of Agricultural Production Engineering)

Received June 17, 1994

Summary

Nondestructive measurement of Brix value in Japanese pear ('Kousui' and 'Housui') in the various developing stages was conducted by near-infrared (NIR) spectroscopy. Brix values of the 'Kousui' were measured at six wavelengths of 1508, 1668, 1932, 2132, 2212 and 2400nm. At these wavelengths, the calibration equation obtained by the multiple linear regression indicated that the multiple linear correlation coefficient (R) was 0.96, standard error of calibration (SEC) 0.50, and bias corrected standard error of prediction (SEP) 0.49. This equation fitted accurately for the Brix value of the 'Housui' as well. The accuracy of calibration was considerably different depending on the year of harvest: the values of SEP and bias for the fruits harvested in a given year were smaller than those for the fruits done in 1991 and 1992. However, the accuracy of equation was improved to fit by adapting a bias correction or by combining data of the two years. The calibration accuracy was also affected by the temperature; the bias obtained at 25, 28 and 31 °C were considerably larger than at constant temperature.

Key words: Nondestructive measurement, Near-infrared (NIR) spectroscopy, Brix value, Japanese pear, Various developing stages

1. 緒 言

現在、農産物の選別は、形状及び色沢等の外観によるものが主である。特に、果実類の選果においては、一部で抜き取り検査が行われているが、そのほとんどは外観によるものである。

農産物の非破壊品質評価が可能であれば、消費者は好みとする内部品質の農産物を手にすることができるし、生産者はこれを栽培管理へ利用することで、栽培技術の向上も可能となる。

近赤外線は、可視光線と赤外線の間であり、上限、下限共に波長の限界は明瞭ではないが、一般に800~2500nmの電磁波をさす。近赤外域における吸収はすべて赤外域における基準振動の倍音または結合音による振動によって生じ、赤外域では得ることのできない様々な成分情報

* 現在日清製粉株式会社

** 現在鹿児島大学大学院連合農学研究科

を得ることができる¹⁾²⁾。

近赤外分光法の非破壊品質評価に関する研究は、1960年代から始まり、1978年にはカナダ穀物委員会 (CGC) 及び米国農務省穀物検査機関 (FGIS) が、小麦中のタンパク質検査の公定法として採用したのを始め、数カ国の公的機関で公定法として採用されている。日本においても醬油の工程管理やサトウキビのショ糖含量測定法の公定法として採用され³⁾⁴⁾、注目を集めている。

近赤外分光法による果実類の品質評価では、桃や温州ミカン等の糖度 (Brix 値) 測定において高い精度が報告されている⁵⁾⁶⁾⁷⁾。但し、これらは成熟果の糖度測定が中心となっており、肥大生育中の果実に対する応用例は見ない。そこで、本研究では近赤外分光法を用いて肥大生育中から成熟までのナシ果実の糖度の非破壊評価法について検討した。

2. 材料及び方法

2. 1 供試材料

供試したナシは、佐賀県伊万里市南波多の桑本梨園で露地栽培されたもので、品種は幸水 (*Pyrus serotina* var. *culta* 'Kousui') 及び豊水 (*Pyrus serotina* var. *culta* 'Housui') である。

試料は、幼果から成熟果を5月から7月にわたり定期的に採取した。試料の採取は定期的に行い果実の採取は同一の圃場内で、樹木や位置を限定せずにランダムに行った。

本報では、1991年度と1992年度の2期分を試料として用いた。それぞれの試料の採取日及び試料数を Tab. 1 に示した。

2. 2 データ測定手順

果実の採取からデータ測定の手順を Fig. 1 に示した。採取した果実は、研究室に持ち帰り、翌日、果実の近赤外吸収スペクトルを測定した。本研究では、近赤外分光分析装置としてプランルーベ社製インフラライザー500を使用した。本装置の分光器は回折格子型で、光学系は積分球方式である⁸⁾。スペクトルは1100~2500nmの範囲を2 nm 間隔で走査測定した。スペクトルの測定は、暗黒ボックス内で、果実の赤道部に対し、光ファイバプローブを垂直に密着させて行った。スペクトル測定時の果実の品温は28°Cとした。ただし、'92年度産の幸水は、品温の影響を検討するために、25, 28及び31°Cの3種類の品温でスペクトルの測定を行った。

スペクトル測定後、測定部位を5 mmの深さで切り取り、切片を搾汁した。次に果汁の糖度

Table 1 Number of samples and the date of harvest

No	Samoles	n	Date
1	'Kousui'1991	112	$\frac{5}{26}$, $\frac{7}{3}$, 12, 17, 26, $\frac{8}{1}$, 15, 20
2	'Housui'1991	98	$\frac{7}{26}$, $\frac{8}{1}$, 8, 15, 20, 29, $\frac{9}{4}$, 11
3	'Kousui'1992	96	$\frac{7}{24}$, 30, $\frac{8}{23}$, 20, 27

n : Number of samples tested

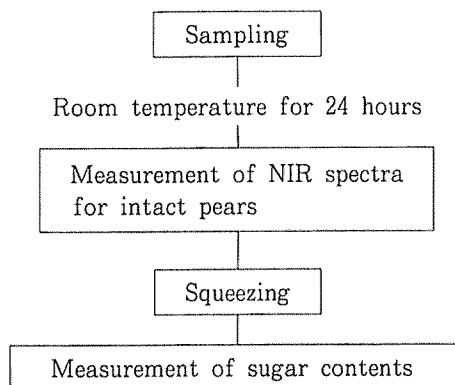


Fig. 1 Procedure of sample preparation for NIR Measurement followed by conventional method

(°Brix) をアタゴ社製デジタル糖度計 (PR-1) を用いて測定した。

選択波長の帰属を確認するために、果糖の標準液を作製した。溶液の濃度は、10、20及び30%とした⁹⁾。標準液の近赤外スペクトルは、プリティッシュカップに標準液を約0.1mlを滴下し、カバー・ガラスを被せて測定した。

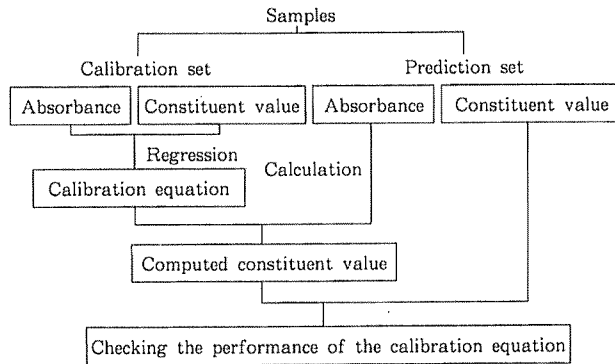


Fig. 2 Procedure of multiple regression analysis

2. 3 重回帰分析による検量線の作成とその評価

重回帰分析による検量線の作成と評価の手順を Fig. 2 に示した。まず、試料を糖度に基づき検量線作成用試料 (Calibration set) と評価用試料 (Prediction set) に分けた。その際に、両試料の成分値が、広い範囲で均等に分布するように、また、検量線作成用試料は評価用試料よりも糖度のレンジが広がるようにサンプリングした。

重回帰分析は、検量線作成用試料の近赤外スペクトルデータを説明変数、糖度を目的変数として、近赤外分光分析装置に付属の IDAS PROGRAM を用いて変数増加法により行った。

選択波長の帰属は、ナシに最も多く含まれる糖である果糖の近赤外スペクトルを用いて確認した。

3. 結果及び考察

3. 1 果実の近赤外スペクトル

Fig. 3 に幸水果実の原スペクトルを示した。1450nm と1930nm 付近の上向きピークは、水に由来するものである。各スペクトルにおいて、上下方向の直流成分的な平行移動が見られるが、これは試料表面の物理的特性の違いによる光の反射や散乱に起因するものである。そこで、これらの影響を軽減し、吸収帯の位置を明確にするために原スペクトルに2次微分処理を施した。以下に2次微分の条件を示した。

wavelength between output point : 4.0nm

(波長の出力間隔)

wavelength in moving average : 24.0nm

(移動平均の波長間隔)

wavelength per derivative segment : 24.0nm

(微分セグメントの波長間隔)

wavelength between derivative segments : 30.0nm

(微分セグメント間の波長間隔)

Fig. 4 に、Fig. 3 に示した原スペクトルの2次微分スペクトルを示した。原スペクトル

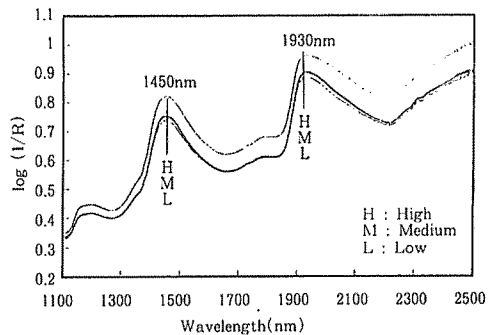


Fig. 3 Original NIR spectra for typical pears having high, medium and low Brix value.

の極大吸収は2次微分スペクトルでは負方向のピークとして現れる。2次微分スペクトルにおける1450nmと1930nm付近の下向きのピークは水に由来するものである。これ以外に、1100~1200nm付近、1600~1800nm付近、2000~2500nm付近に負方向の吸収が見られ、2次微分処理により、原スペクトル上では確認できない微細な吸収を明確にすることができた。

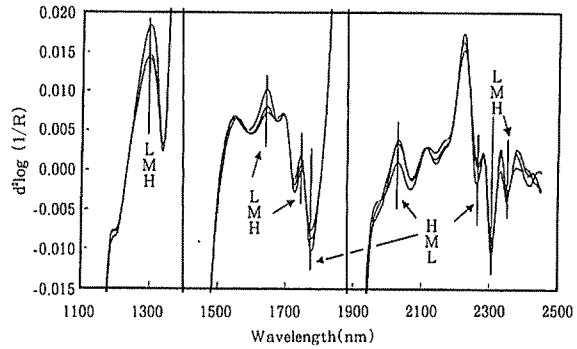


Fig. 4 The 2nd derivative spectra for typical pears having high, medium and low Brix value.
H: High M: Medium L: Low

3. 2 糖度測定用検量線の作成及びその評価

'91年度に露地栽培された幸水を用いて、糖度測定用検量線の作成を行った。検量線作成用試料と評価用試料の基礎統計値を Tab. 2 に示した。

検量線は検量線作成用試料の各果実の2次微分スペクトルと糖度測定値を用いて重回帰分析により作成した。その結果を Tab. 3 に示した。

1~7波長までの重回帰式を見ると、選択された波長数が増えるほど、重相関係数(R)は大きくなり、また検量線作成時の標準誤差(SEC)は減少した。しかし検量線評価時の標準誤差(SEP)を見ると6波長の検量線が最も小さくなり、7波長ではこれより大きくなった。つまり7波長の検量線は、検量線作成用試料のみに適合し、それ以外の未知試料には適合せず、オーバーフィッティングとなったことを示した。よって、1508nm, 1668nm, 1932nm, 2132nm, 2212nm, 2400nmの6波長の重回帰式を糖度測定用の検量線として採用した。以下に検量

Table 2 Statistic values of calibration sample set and prediction sample set of 'Kousui' harvested in '91

	n	range (°Bx)	mean (°Bx)	S. D. (°Bx)
Calibration set	92	6.8~13.2	9.81	1.80
Prediction set	55	6.9~12.6	9.83	1.65

n: Number of samples
S.D.: Standard deviation

Table 3 Multiple linear regression analysis of second derivative reflectance measurements for Brix in intact Japanese pear 'Kousui' harvested in 1991.

Wavelength (nm)							R	SEC	SEP	Bias
λ_1	λ_2	λ_3	λ_4	λ_5	λ_6	λ_7				
1744							0.818	1.05	0.91	0.13
1656	1744						0.882	0.86	0.66	0.03
1664	1744	2128					0.913	0.75	0.63	0.03
1664	1744	2132	2392				0.923	0.71	0.58	0.03
1508	1668	1932	2132	2212			0.958	0.53	0.51	0.00
1508	1668	1932	2132	2212	2400		0.963	0.50	0.49	-0.01
1508	1668	1932	2132	2212	2344	2400	0.965	0.49	0.52	-0.01

R : Multiple correlation coefficient
SEC : Standard error of calibration
SEP : Bias-corrected standard error of prediction

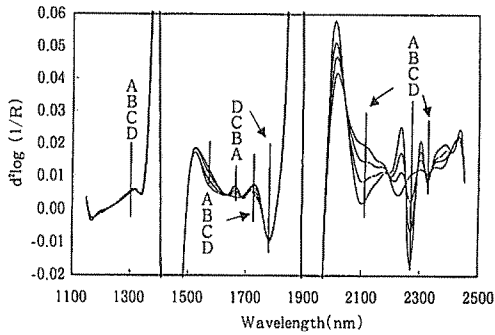


Fig. 5-a The 2nd derivative spectra of fructose model solutions having 3 different concentrations and water. A: 0% (Water), B: 10%, C: 20%, D: 30%

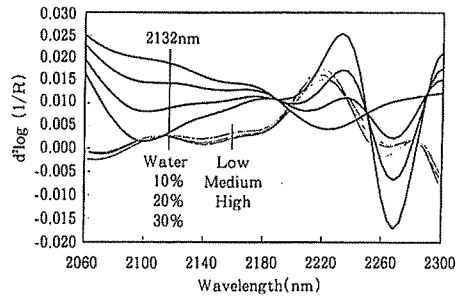


Fig. 5-b The 2nd derivative spectra of the 3 different concentration of fructose solutions, water and intact pears having different Brix value. — : Pear — : Fructose

線の式を示した。

$$\begin{aligned} \text{Brix} (\%) = & 14.52 - 1304.43 L (2132) - 419.06 L (2212) \\ & - 218.27 L (2400) + 196.62 L (1932) + 1418.45 L (1668) \\ & + 1892.39 L (1508) \end{aligned}$$

ここで、 $L(\lambda) = d^2 \log(1/R_\lambda)$ とする。

この時、Rは0.963, SECは0.50, SEPは0.49, 予測値と実測値の差の平均 (Bias) は-0.01となった。

予測値と実測値において t 検定を行った結果, 1%の危険率で有意に適合し, 実用可能であると判断された。

検量線の重回帰係数が負の方向に最も大きな値となるのは2132nmであった。従って2132nmは, ナシの糖度測定におけるキーバンドであると考えられた。そこで, 幸水に最も多く含まれる果糖の標準液を用いて2132nm付近の吸収帯の帰属を確認した。Fig. 5-aに果糖標準液の2次微分スペクトルを, Fig. 5-bに果実と果糖標準液の2次微分スペクトルを示した。

果糖標準液のスペクトルより, 2050nm~2180nmは果糖の吸収帯であると考えられる。一方, 果実のスペクトルを見ると, 選択波長である2132nm付近に糖度が高くなるほど負方向の吸収が大きくなる波長帯がある。この波長帯は果糖の吸収帯の中にあるため, 2132nmは果糖の吸収帯から選択されていることが分かった。

この検量線を用いた評価用試料の糖度予測値と糖度計による実測値を Fig. 6 に示した。縦軸は予測値で横軸は実測値である。このとき, 標準誤差は0.49となり, 糖度に基づき果実を選別するには十分な精度といえる。

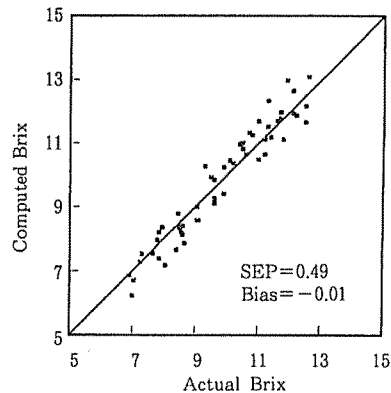


Fig. 6 Plot of actual and computed Brix using the prediction set

Table 4 Statistic values of calibration and prediction sample sets.

Varieties	Calibration set				Prediction set			
	n	range*	mean*	S.D.*	n	range*	mean*	S.D.*
'Kousui'	92	6.8~13.2	9.81	1.80	55	6.9~12.6	9.83	1.65
'Kousui'	81	8.1~14.4	11.02	1.62	51	8.5~13.9	10.92	1.45
Combined ^{a)}	173	6.8~14.4	10.38	1.82	106	6.9~13.9	10.35	1.65

^{a)} Combined sample set of 'Kousui' harvested in '91

n : Number of samples

S. D. : Standard deviation

* : °Brix

Table 5 Multiple linear regression analysis of second derivative reflectance measurements for calibration set in intact Japanese pears 'Kousui', 'Housui' and combined samples harvested in 1991.

Varieties	Wavelength (nm)						R	SEC	SEP	Bias
	λ1	λ2	λ3	λ4	λ5	λ6				
Kousui	1508	1668	1932	2132	2212	2400	0.96	0.50	0.49	-0.01
Housui	1396	1508	1752	1804	1880	2140	0.90	0.75	0.85	-0.03
Combined	1500	1668	1756	1928	2140		0.94	0.64	0.71	-0.08

R : Multiple correlation coefficient

SEC : Standard error of calibration

SEP : Bias-corrected standard error of prediction

3. 3 糖度の測定精度に影響を及ぼす種々の

要因とその補正法

これまで、同じ母集団の試料で、検量線の作成とその評価を行ったが、実際の選果場での検量線の使用を想定すると、品種、栽培法、栽培年度や品温等が異なる試料の糖度測定を行う必要がある。そこで、これらの条件が糖度測定にどのような影響を及ぼすのか、さらに、その補正法について検討した⁵⁾。

3. 3. 4 品種の影響

'91年度産露地栽培幸水と'91年度産露地栽培豊水を用いて、品種の違いが測定精度にどのような影響を及ぼすのかを検討した。検量線作成用試料として、幸水、豊水及び幸水と豊水の合同試料をそれぞれ用い、重回帰分析により3本の検量線を作成した。ここで幸水の検量線は先に作成した検量線を用いた。各試料の基礎統計値を Tab. 4 に、作成した各検量線を Tab. 5 に示した。豊水及び合同試料のキーバンドは1752 nm 及び1756nm であり、これらは Fig. 5-a より果糖の吸収帯から選択されたことが判った。豊水の検量線は幸水のそれと比較して低い精度となった。この原因として、豊水は幸水と比較すると果皮が厚く一面にコルク層を形成しているため、近赤外線が果肉部まで十分に到達していないことが考えられた。

次に、これら各3本の検量線を用いて幸水

Table 6 Effect of sample variety on accuracy of prediction with the calibration equation shown in table 5

Calibration equation	Prediction set			
	'Kousui'		'Housui'	
	SEP	Bias	SEP	Bias
'Kousui'	0.49	-0.01	0.81	-0.04
'Housui'	0.76	-0.53	0.85	-0.03
Combined	0.58	-0.03	0.83	-0.12

及び豊水の糖度測定を行った。その結果を Tab. 6 に示した。幸水の糖度測定においては、幸水>合同試料>豊水の検量線の順に測定精度が高くなり、検量線の測定精度に品種間の有意差が確認された。豊水の糖度測定においては、全般的に幸水よりも低い精度で、幸水>合同試料>豊水の検量線の順に測定精度が高くなったが、各測定結果に有意差は認められなかった。つまり、幸水及び豊水の2品種の糖度測定については、幸水の検量線により対応可能であることが示唆された。Fig. 7 に幸水の検量線による豊水の糖度測定結果を示した。

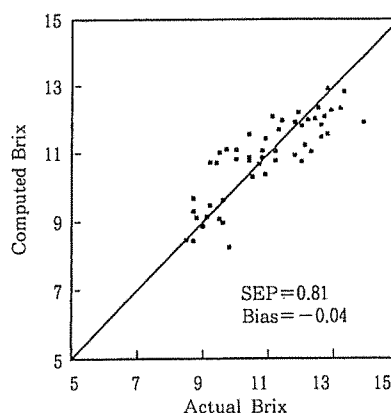


Fig. 7 Plot of actual and computed Brix with calibration equation of 'Kousui' using prediction set of 'Housui'

3. 3. 1 栽培年度の影響

'91年度産露地栽培幸水（以下，'91年度産幸水）と'92年度産露地栽培幸水（以下，'92年度産幸水）を用いて、栽培年度の違いが測定精度にどのような影響を及ぼすのかを検討した。検量線作成用試料として、'91年度産幸水、'92年度産幸水及び'91年度と'92年度産幸水の合同試料をそれぞれ用い、重回帰分析により3本の検量線を作成した。各試料の基礎統計値を Tab. 7 に、作成した各検量線を Tab. 8 に示した。'92年度産幸水及び合同試料の検量線におけるキーバンドは1764nm及び1200nmであり、Fig. 5-a より、これらは果糖の吸収帯から選択されたことが判った。

次に、これら各3本の検量線を用いて'91年度産幸水及び'92年度産幸水の糖度測定を行った。その結果を Tab. 9 に示した。'91年度産幸水の糖度測定においては、'91年度産幸水>合同試料>

Table 7 Statistic Values of calibration and prediction sample set.

Harvested year	Calibration set				Prediction set			
	n	range*	mean*	S.D.*	n	range*	mean*	S.D.*
'91 ^{a)}	92	6.8-13.2	9.81	1.80	55	6.9-12.6	9.83	1.65
'92 ^{b)}	77	7.4-12.6	10.36	1.37	66	7.7-12.3	10.36	1.17
Combined ^{c)}	169	6.8-13.2	10.06	1.64	121	6.9-12.6	10.14	1.44

^{a)}'Kousui' harvested in '91, ^{b)}'Kousui' harvested in '92, ^{c)} Combined sample set of 'Kousui' harvested in '91 and '92. S. D.: Standard deviation

n: Number of samples

*: °Brix

Table 8 Multiple linear regression analysis of second derivative reflectance measurements for each calibration set in intact Japanese pears 'Kousui' harvested in 1991, 1992 and combined.

Harvested year	Wavelength (nm)							R	SEC	SEP	Bias
	λ1	λ2	λ3	λ4	λ5	λ6	λ7				
'91	1508	1668	1932	2132	2212	2400		0.96	0.50	0.49	-0.01
'92	1204	1292	1616	1688	1764	2212		0.95	0.46	0.46	0.09
Combined	1200	1280	1604	1664	1708	1776	1888	0.94	0.64	0.71	-0.08

R : Multiple correlation coefficient

SEC : Standard error of calibration

SEP : Bias-corrected standard error of prediction

'92年度産幸水の検量線の順に測定精度が高くなったが、'91年度産幸水と合同試料の測定結果に有意差は認められなかった。また、'92年度産幸水の検量線は、測定時の標準誤差 (SEP) が増大した (Fig. 8-b)。'92年度産幸水の糖度測定においては'92年度産幸水 > 合同試料 > '91年度産幸水の検量線の順に測定精度が高くなったが、'92年度産幸水と合同試料の測定結果に有意差は認められなかった。

また、'91年度産幸水の検量線は、測定時のバイアスが増大した (Fig. 8-a)。以上より、検量線と栽培年度が異なる試料の測定を行うと、SEP もしくはバイアスの増大が生じることが確認された。しかし、いずれの場合も栽培年度が異なる試料を合わせた合同試料により検量線を作成することで測定精度が維持できることが判った。合同試料による測定結果を Fig. 9 に示した。

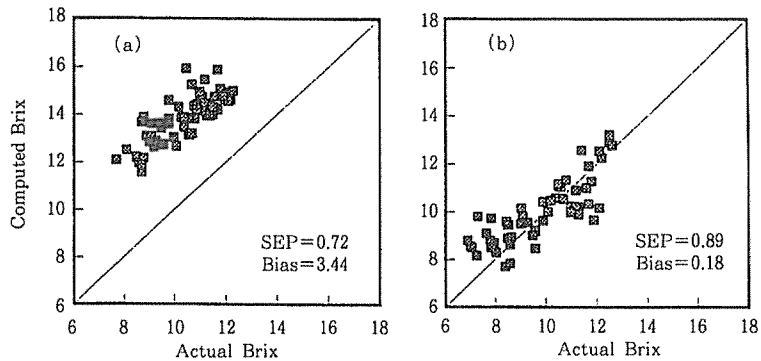


Fig. 8 Effect of harvest year on prediction. (a) Samples harvested in '92 were predicted by the equation of '91. (b) Sample harvested in '91 were predicted by the equation of '92.

3. 3. 3 品温の影響

'92年度露地栽培幸水を用いて、品温の影響を検討した。試料の近赤外スペクトルは、果実の品温を、25°C、28°C、31°Cに調整して測定した。検量線は品温28°Cの試料で作成し、品温25°Cと31°Cの試料の糖度測定を行った。測定結果を Fig. 10 に示した。

この結果より、検量線作成用試料よりも品温が低い試料の測定を行うと、実測値よりも予測値が大きくなり、品温が高い試料を測定すると逆に予測値が小さくなることが分かった。

近赤外域は官能基の振動による吸収であるため、温度が変化すると吸収帯の位置がシフトすることが知られており、これによりバイアスが

Table 9 Effect of harvest year on accuracy of prediction with the calibration equation shown in table 8

Calibration equation	Prediction set			
	91		92	
	SEP	Bias	SEP	Bias
'91	0.49	-0.01	0.72	3.44
'92	0.96	0.18	0.46	0.09
Combined	0.53	-0.05	0.50	-0.05

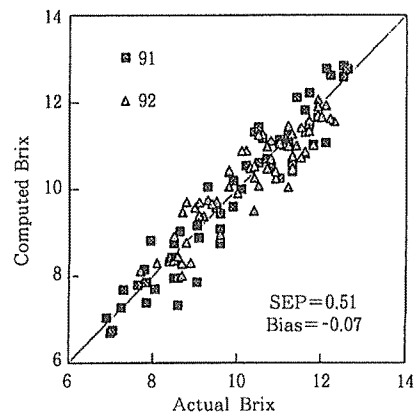


Fig. 9 Plot of actual and computed Brix. Samples harvested in '91 and '92 were predicted by the equation of combined sample set.

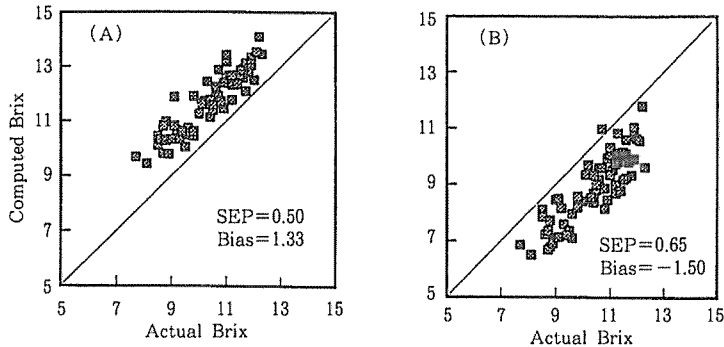


Fig. 10 Effect of sample temperature on prediction

(A) Calibration equation: 28 Prediction set: 25°C

(B) Calibration equation: 28 Prediction set: 31°C

増加することが考えられる。従って、検量線作成用試料と温度の異なる試料の測定を行う際には、バイアス補正を行うか、スペクトル測定時の品温を一定に保つ必要があることが判った。

摘 要

近赤外分光法による肥大生育から成熟期までのナシ果実の糖度測定を試み、さらに、品種、栽培年度及び果実の品温が近赤外法の測定精度に及ぼす影響について検討した。

供試したナシは佐賀県伊万里市において露地栽培された幸水及び豊水を用いた。ナシ果実の採取は、幼果から成熟果までを集めるために6月～8月にわたって定期的に行った。

1) 1991年度産幸水の糖度測定検量線は、1508, 1668, 1932, 2132, 2212, 及び2400nmの6波長の吸光度を説明変数とする重回帰式であった。この時、 $R=0.96$, $SEC=0.50$, $SEP=0.49$, $Bias=-0.01$ であった。

2) 幸水及び豊水の検量線を用いて品種の影響を検討した結果、幸水の糖度測定検量線は幸水と豊水の糖度測定に共通して使用可能であることが判った。

3) 1991年度産と1992年度産の幸水を用いて栽培年度の影響を検討した結果、検量線作成用試料と栽培年度の異なる試料を測定するとSEPもしくはバイアスが増加した。しかし、栽培年度が異なる試料を合わせた合同試料で検量線を作成することにより測定精度が維持可能であることが判った。

4) 品温が25°C, 28°C, 31°Cの試料群(1992年度産幸水)を用いて、品温の影響を検討した。検量線作成用試料と品温の異なる試料を測定すると、バイアスが増加した。従って、測定精度を維持するには、検量線のバイアス補正を行うか、スペクトル測定時の品温を一定に保つ必要があることが判った。

参 考 文 献

1. 岩元陸夫(1983). 食品成分の非破壊分析法—光学的方法を中心として—. ぶんせき 1, 46-54.
2. 河野澄夫(1992). 近赤外分光法による品質評価の現状と今後の課題. 食料—その化学と技術—30, 27-42.
3. 河野澄夫(1989). 食品と技術(情報速報) 4, 3-9.
4. S. Kawano, K. Takehara, T. Sato and M. Iwamoto (1991). Determination of sucrose content in

- sugarcane juice by NIR spectroscopy. *The proceedings of the third international near infrared spectroscopy conference 2*, p.510-516.
5. Sumio Kawano, Hisayoshi Watanabe and Mutsuo Iwamoto (1989). Measurement of sugar contents in intact peaches by NIRS. *Proceedings of the 2nd international NIRS conference*. Tsukuba Japan, p.343-352.
 6. 河野澄夫, 藤原孝之, 佐藤哲生, 岩元睦夫(1991). 近赤外透過スペクトルによるウンシュウミカン果実糖度の非破壊測定. 日本食品工業学会第38回大会講演集, 98.
 7. Sumio Kawano, Tetuo Sato and Mutuo Iwamoto (1991). Determination of sugars in satuma orange using NIR transmittance. *Making Light Work: Advances in Near Infrared Spectroscopy*. VHC, New York, p 387-393.
 8. 河野澄夫, 岩元睦夫, 近赤外分光分析装置. 月間食品流通技術 **243**, 127-133.
 9. E. Lanza, B.W.LI (1984), Application for near infrared spectroscopy for predicting the sugar contents of fruit juice. *Journal of food science* **49**, 995-998.