

## 脂質劣化に基づく玄米の励起蛍光マトリクス解析の改善

石垣 貴大\*1, 田原 裕介\*2, 高津 地志\*3, 藤田 明子\*3, 渡邊 義之\*4, 野村 正人\*5

### Improvement of Excitation-Emission Matrix Analysis for Brown Rice Based on Lipid Deterioration

Takahiro ISHIGAKI\*1, Yusuke TAHARA\*2, Kunimoto TAKATSU\*3, Akiko FUJITA\*3, Yoshiyuki WATANABE\*4, and Masato NOMURA\*5

The relationship between the excitation-emission matrix of powdery brown rice, whose cultivars were Hinohikari, Koshihikari and Kirara397, and the index of lipid deterioration in the rice, such as the fatty acid value and the peroxide value, during storage period was examined to evaluate the freshness of brown rice. A partial least squares regression analysis for each cultivar of brown rice was effective for improving the correlation between measured and predicted values.

Keywords: Brown Rice, Excitation-Emission Matrix, Fatty Acid Value, Lipid Deterioration, Peroxide Value

#### 1. はじめに

小麦, トウモロコシとともに世界三大穀物とされる米は, 全世界中で年間約4億8,000万トン生産されており, その大半がアジアを中心とした地域で作られ, 日本を含むアジア諸国では主食として食されている。米は, ジャポニカ種, インディカ種およびジャバニカ種に分類され, 世界で最も多く生産および消費されているのはインディカ種であるが, 日本では主にジャポニカ種が生産・消費されている。近年, 米の品種改良が盛んにおこなわれており, イネの人工交配によって優れた品種同士を組み合わせる交雑育種法が考案され, 狙った特性を持たせることが可能になっている。品種改良を行うことで, 米の収穫量や食味を向上させたり, さらには病気や冷害への耐

性を持った新しい品種を生み出すことが可能となる。これらによって, より安全性の高い作物をより低コストで生産することが可能となる。

米は水分含量が低く, 比較的長期間の保蔵が可能だが, その食味は貯蔵期間が長くなるにつれて徐々に低下していく。食味低下の原因としては水分, 温度, 湿度などの物理的要因, 酵素作用, 酸化などの化学的要因, そして微生物や害虫などの生物的要因がある<sup>1)</sup>。様々な要因の中でも, 遊離脂肪酸の増加は米の品質に大きな影響を与えることから, 米の劣化度合いを判定する指標として脂肪酸度が用いられる。遊離脂肪酸量を測定する方法として, 酸-塩基滴定法を用いた脂肪酸度測定が知られているが, この方法は多量の試料, 試薬を必要とするうえ, 前

原稿受付 2018年4月28日

\*1 近畿大学 大学院システム工学研究科 システム工学専攻 (〒739-2116 東広島市高屋うめの辺1番)

\*2 近畿大学 工学部 化学生命工学科 (〒739-2116 東広島市高屋うめの辺1番)

\*3 株式会社サタケ 食味研究室 (〒739-8602 東広島市西条西本町2-30)

E-mail g-syokumi@satake-japan.co.jp

\*4 近畿大学 大学院システム工学研究科 システム工学専攻 教授, 工学部 化学生命工学科 教授, 次世代基盤技術研究所 教授 (〒739-2116 東広島市高屋うめの辺1番)

E-mail wysyk@hiro.kindai.ac.jp

\*5 近畿大学 大学院システム工学研究科 システム工学専攻 教授, 工学部 化学生命工学科 教授 (〒739-2116 東広島市高屋うめの辺1番)

E-mail nomura@hiro.kindai.ac.jp

連絡先: 渡邊義之 (研究代表者)

処理に時間がかかるという欠点がある。また、滴定の終点を目視により確認するため誤差が生じやすく、再現性が得られにくい。そこで、試薬を使用することなく、迅速な測定が可能である蛍光分光光度計を用いた分析方法が食品分野でも利用されており、マンゴーの産地判別<sup>②</sup>、小麦カビの汚染濃度の定量推移<sup>③</sup>、そば粉と小麦粉の混合割合の推定<sup>④</sup>など、様々な測定対象物についても蛍光分光光度計の適用が検討されている。励起蛍光マトリクスは、励起波長および蛍光波長をともに走査することにより得られ、励起・蛍光波長と蛍光強度の組み合わせからなる膨大な3次元データから構成される。そのため、励起蛍光マトリクスを得ることで、特定の波長では判別できない蛍光の特徴を網羅的に取得することが可能となるため、物質の詳細な蛍光特性を理解することにつながる。励起蛍光マトリクスは物質あるいは成分固有の蛍光特長を反映しているため、その手法は未知の試料の中から物質や成分を特定するための判断に適した手法である。

著者らは、これまでに蛍光分光光度計を用いた玄米の非破壊的鮮度評価の可能性を検証すべく、脂質含有食品の鮮度評価指標として知られる脂肪酸度<sup>⑤</sup>と劣化初期状態を表す過酸化価<sup>⑥</sup>などの測定値と励起蛍光マトリクス計測で得られたデータを用いて回帰分析を行い、励起蛍光マトリクスと理化学特性値との相関関係を検証し、励起蛍光マトリクス法が玄米の鮮度評価の推定に活用できる可能性が示された<sup>⑦</sup>。そこで、本研究では、更なる鮮度評価精度の改善を図るべく、玄米試料の品種の違いが励起蛍光マトリクス法による評価に及ぼす影響について検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1 材料および試薬

フェノールフタレイン、水酸化カリウム、硫酸アンモニウム鉄(II)六水和物、ヨウ化カリウム、0.1 M 硫酸、硫酸キニーネおよびジエチルエーテルは和光純薬工業(株)、ヘキサン、クロロホルムおよびメタノールは米山薬品工業(株)、99.5%エタノールは上野化学工業(株)、塩酸は関東化学(株)、1-ブタノールはキンダ化学(株)からそれぞれ購入した。平成19年～28年産の魚沼産コシヒカリ、広島県産ヒノヒカリおよび北海道産きさらぎ397の3品種の玄米が、試料として使用された。

### 2.2 米の貯蔵

各種玄米試料が-18℃の冷凍庫内で保存され、必要な時に取り出され測定に使用された。

### 2.3 脂肪酸度の測定

既報<sup>⑤, ⑦</sup>の手順に従い、脂肪酸度の測定を行った。玄米試料をミルサー(800DG, 岩谷産業(株))で1分間粉碎し

た。粉碎された米試料を200 mL容共栓付き三角フラスコに約10 g秤量し、その後ヘキサンを50 mL加え、30℃の恒温水槽にインキュベートしながら、200 rpmで15分間振とう攪拌した。この試料溶液を吸引ろ過し、ろ液を脂肪酸抽出液とした。抽出液25 mLを別の200 mL容三角フラスコに測り取り、0.2 gのフェノールフタレインを500 mLの99.5%エタノールに溶解させて調製されたフェノールフタレイン-エタノール溶液25 mLを加えて滴定に供した。1.4 gの水酸化カリウムを500 mLの蒸留水を溶解させて調製された0.05 mol/L水酸化カリウム標準溶液と、10 mL容ビュレット(目盛幅:0.02 mL)を用いて滴定が実施された。滴定では、試料溶液の微紅色が30秒間持続した時点を終点とした。ブランク測定では、25 mLのヘキサンを抽出液の代わりに代用した。各品種の米試料について3回の脂肪酸抽出を行い、各抽出液についてそれぞれ3回の滴定を行なった。滴定値として、それぞれ9回の測定結果の平均値を採用した。測定条件および結果を式1に適用して脂肪酸度を算出した。

$$D = (A - B) \times 1.004 \times 2.805 \times \frac{50}{25} \times \frac{100}{E \times \frac{100}{100 - C}} \quad \text{式 1}$$

ここで、 $A$ は試料の滴定値[mL]、 $B$ はブランクの滴定値[mL]、 $C$ は試料水分[%]、 $D$ は脂肪酸度[mg-KOH/100 g]、 $E$ は試料量[g]、2.805は0.05 mol/L KOH標準溶液1 mLに含まれるKOHの質量[mg]を、それぞれ表す。水分量の測定では、粉碎された玄米試料をシャーレに移し、105℃の定温乾燥機(DO-450A, アズワン(株))内で、3時間加熱した。加熱前と加熱後の試料の重量を計測し、玄米の水分率を算出した。

### 2.4 過酸化価の測定

既報<sup>⑥, ⑦</sup>の手順に則り、過酸化価(POV)を測定した。上記2.3で調製された脂肪酸抽出液25 mLを200 mL容ナスフラスコに入れ、ロータリーエバポレータ(RE200A-W, ヤマト科学(株))と50℃のウォーターバス(BW200, ヤマト科学(株))を用いてヘキサンと油分を分留した。得られた油分の質量を測定した後、試験管内で油分と10 mLのメタノール-1-ブタノール溶液(1:2(v/v))を混合した。油分を溶解させたメタノール-1-ブタノール溶液を、3本の遠心沈降管に2.7 mLずつ分注した。0.22 mLの塩酸と100 mLのメタノールを用いて25 mmol/L塩酸メタノール溶液が、また0.9 gの硫酸アンモニウム鉄(II)を100 mLの蒸留水に溶解させて12.5 mmol/L硫酸アンモニウム鉄(II)水溶液が、それぞれ調製された。これらの溶液を120 μLずつ遠心沈降管に添加しよく攪拌した。さらに、約12 gのヨウ化カリウムを約10 mLの蒸留水に加えて調製された飽和ヨウ化カリ

ウム水溶液 80  $\mu$ L を添加して、十分に攪拌した。その後、遠心分離機 (CN-2060, アズワン(株)) を用いて、3,000 rpm にて 3 分間遠心分離を行なった。飽和ヨウ化カリウム水溶液を加えてから 15 分間静置後、3 本の遠心沈降管の上清を分光光度計 (V-630, 日本分光(株)) に供して波長 360 nm での吸光度を測定した。各品種の玄米試料について 3 回の油分抽出を行い、それぞれ 3 回の吸光度測定を行ない、それぞれ 9 回の測定結果の平均値が採用された。測定結果が式 2 に適用されて、過酸化価が算出された。

$$\text{POV}[\text{meq./kg - oil}] = \frac{\text{Abs}_{363\text{nm}} \times V \times F}{\epsilon_{363\text{nm}}} \quad \text{式 2}$$

ここで、 $\text{Abs}_{360\text{nm}}$  は 360 nm における吸光度、 $\epsilon_{360\text{nm}}$  は 360 nm における  $\text{I}_3^-$  のミリモル吸光係数 [ $\text{mM}^{-1}$ ] (18.3 mmol/L)、 $V$  は反応溶液の体積 [L]、 $F$  は脂質量を 1 kg あたりに換算する希釈因子 [ $\text{kg}^{-1}$ ] を表す。

## 2.5 励起蛍光マトリクス計測と偏最小二乗解析

蛍光分光光度計 (F-7100, (株)日立ハイテクサイエンス) およびデータオペレーションソフト (FL Solutions2.1, (株)日立ハイテクサイエンス) を用いて励起蛍光マトリクスの測定が行われた。励起波長 ( $E_x$ ) および蛍光波長 ( $E_m$ ) は、いずれも 200 ~ 600 nm の波長区間とされた。5.00 g の粉碎玄米を 3 個のシャーレにそれぞれ秤量し、1 個のシャーレにつき 3 回の測定を行うことで計 9 回測定値が得られた。9 回の測定結果の平均値を蛍光強度とした。各品種それぞれ 7 種類の年産の異なる試料について測定を行い、検量線作成用のキャリブレーション群と検量線検証用のバリデーション群に分けて、多変量解析の一つである偏最小二乗 (PLS) 回帰を適用した。データの解析には統計解析ソフト (JMP12, SAS Institute Japan(株)) が用いられた。独立変数の重要度 (VIP) 値を設定することによって重要な変数の絞り込みを行い、得られた変数から 2 つの理化学特性値を算出するために必要な予測式が作成された。1 回目の PLS 回析での変数重要度プロフィールから、VIP 値の大きい 3 つの説明変数に絞り込みを行った。得られた予測式を用いて、2 つの理化学特性値の実測値と予測値との間で相関性評価の指標となる決定係数  $R^2$  値が最も高い線形グラフが求められた。

## 3. 結果および考察

### 3.1 脂肪酸度の推移

魚沼産コシヒカリ、広島県産ヒノヒカリ、北海道産きらら 397 の脂肪酸度の測定結果を図 1 に示す。

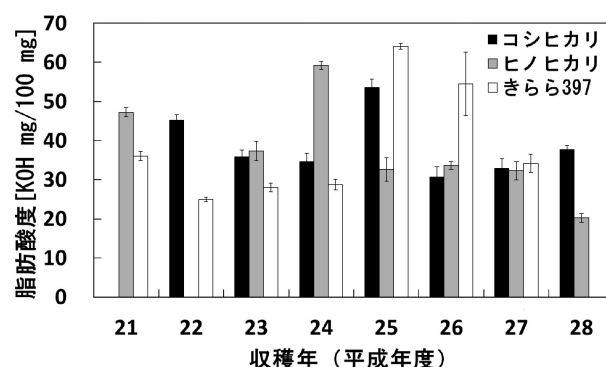


図 1. 玄米の脂肪酸度の推移

コシヒカリ、ヒノヒカリ、きらら 397 のいずれも脂肪酸度は一度大きく値が上昇し、その後減少する傾向が観察された。玄米には約 3% の脂質が含まれており、中性脂質、糖脂質およびリン脂質で構成されている。また、玄米中に含まれる構成脂肪酸は、含有量の多い順にオレイン酸、リノール酸およびパルミチン酸である<sup>6)</sup>。玄米の収穫後の保蔵期間中に脂肪酸度が増加した原因としては、中性脂質であるアシルグリセロールに生じた加水分解反応によって脂肪酸が遊離したことが考えられる。他方、脂肪酸度の減少については、上述のオレイン酸やリノール酸といった不飽和脂肪酸の過酸化反応後の低分子化反応により、アルデヒドやケトンといった低分子の二次生成物が生じ、それら低分子生成物の揮発の可能性が考えられる。

### 3.2 過酸化価の推移

魚沼産コシヒカリ、広島県産ヒノヒカリ、北海道産きらら 397 の玄米の過酸化価の測定結果を図 2 に示す。

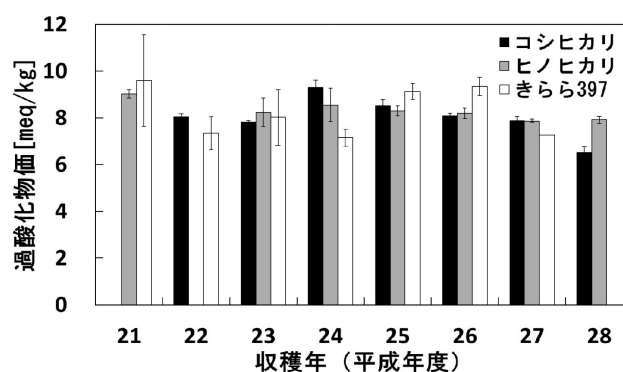


図 2. 玄米の過酸化価の経時変化

過酸化価は、いずれの品種においても貯蔵期間が長くなるにつれて値が上昇していき、その後減少していくという挙動が確認された。過酸化価はヒドロペルオキシドなどの過酸化物の量を示す指標であり、不飽和脂肪酸の酸化に従って値が上昇していく。しかし、時間経過に

つれて過酸化物が分解され、上述のような二次生成物に変化するため値は減少に転じる。これらの結果から、玄米の貯蔵期間中に過酸化物の生成および分解が経時的に進んでいたと考えられる。

### 3.3 励起蛍光マトリクスと理化学特性値との関係

PLS 回帰分析を行った後、重要度の高い変数を用いて理化学特性値の予測式を作成した。そして、予測式と理化学特性値の実測値を用いて線形グラフを作成し  $R^2$  値を求めた。3 品種の玄米におけるデータを同時に解析し作成した線形グラフを図 3 に示す。3 品種の同時解析により作成した検量線の  $R^2$  値は、脂肪酸度が 0.0895、過酸化物価が 0.1314 と低い相関性を示すにとどまった。実測値の誤差に加えて、成分比や蛍光強度などの品種間差が影響し、複数の品種を用いた解析の際に正確な予測を立てることが困難になったことが原因と推察される。より正確な解析を行うには品種別に解析を行う必要があると考えた。

そこで、3 品種の玄米を個別に解析して予測式を算出した。広島県産ヒノヒカリについての相関図を図 4 に示し、各品種における解析に使用された波長と作成された

検量線の相関性の指標となる決定係数を表 1 に示す。品種ごとに解析を行うことで高い相関性を持つ検量線が作成された。しかし、バリデーシオン群による予測式の検証では、実測値と予測値に大幅なずれが生じ、検量線が

表 1. PLS 解析に使用された波長と検量線の決定係数

	脂肪酸度		過酸化物価	
	Ex/Em	$R^2$	Ex/Em	$R^2$
ヒノヒカリ	240/280	0.9507	300/410	0.9958
	250/280		310/400	
	250/290		450/540	
コシヒカリ	240/330	0.8713	220/290	0.9951
	300/330		250/470	
	310/360		290/500	
きらら397	240/340	0.9990	300/390	0.9997
	290/480		300/400	
	320/540		310/410	

乱れる結果となった。収穫年度の違いによる玄米の品質および状態のばらつきから予測が困難になったと考えられる。蛍光強度に加えて新たな説明変数を解析に組み込むことで、より正確な予測値が算出できる可能性がある。

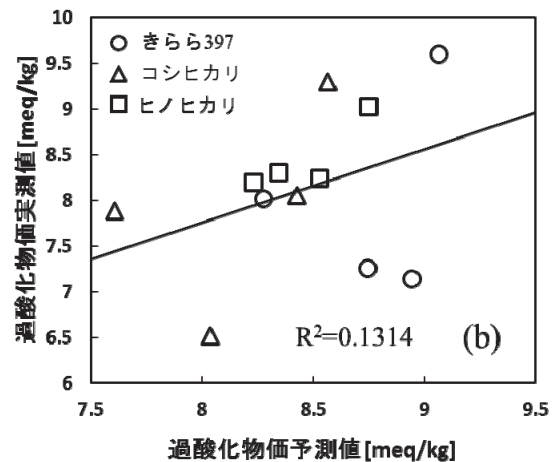
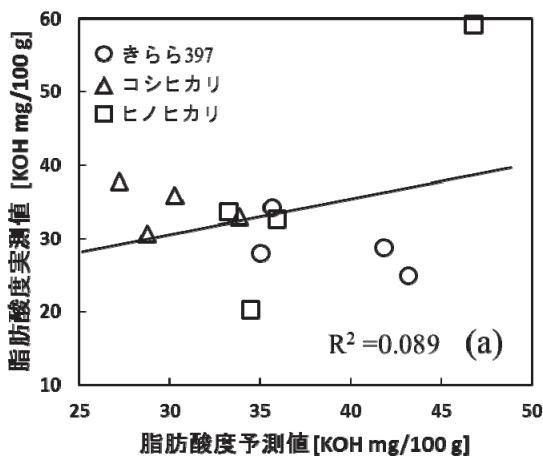


図 3. 3 品種の玄米の理化学特性実測値と予測値との相関関係：(a)脂肪酸度，(b)過酸化物価

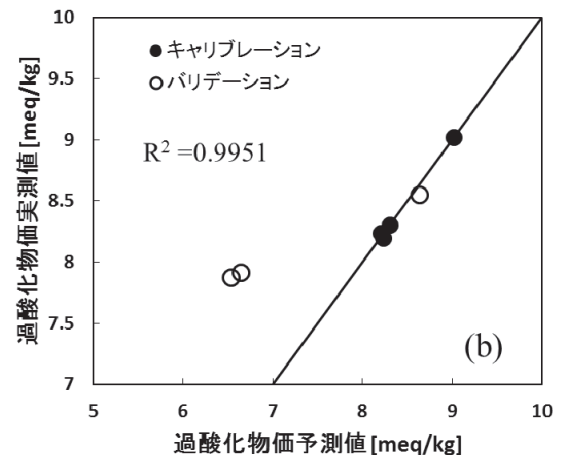
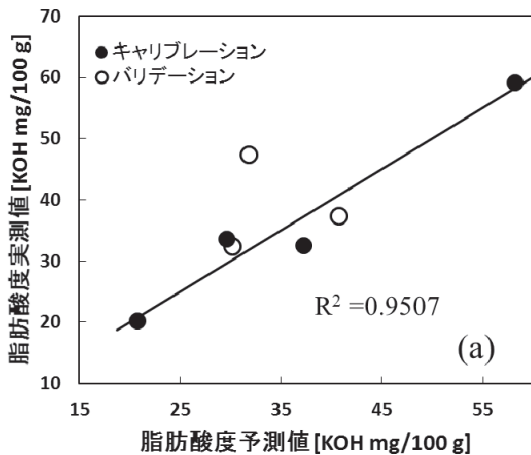


図 4. 広島県産ヒノヒカリ玄米の理化学特性実測値と予測値との相関関係：(a)脂肪酸度，(b)過酸化物価

#### 4. まとめ

3品種での同時解析では、脂肪酸度および過酸化値ともに予測線の相関性が低い結果となった。品種を個別に解析した際には相関性の高い検量線が作成できたため、品種ごとに測定および解析を行うことで、比較的高い精度絞り込みの際に玄米の脂質由来の波長を参考にすることで解析の精度が向上することが期待されるため、脂質の酸化・分解や玄米中の他の成分との反応による励起蛍光マトリクスの変化について検討することが、玄米試料内で生じた現象の解明と測定精度の改善に有効なアプローチになるものと考えられる。

#### 参考文献

- (1) 松田英幸ら, 日本農芸化学会誌, 47 巻 6 号 (1973), pp.379-384
- (2) 中村結花子ら, 日本食品科学工学会誌, 59 巻 8 号 (2012), pp.387-393
- (3) 藤田かおりら, マイコトキシン, 63 巻 2 号 (2013), pp.201-208
- (4) 杉山武裕ら, 日本食品科学工学会誌, 57 巻 6 号 (2010), pp.238-242
- (5) 大坪研一ら, 食品総合研究所研究報告, 51 巻 (1987), pp.59-65
- (6) Erik Løvaas, JAOCS, 69(8), (1992), pp.777-783
- (7) 高津地志ら, 近畿大学次世代基盤技術研究所報告, 8 巻 (2017), pp.61-68
- (8) 藤野安彦ら, 栄養と食糧, 25 巻 6 号 (1972), pp.472-474