

蛍光分光法を用いた 大豆イソフラボン量の簡易推定法

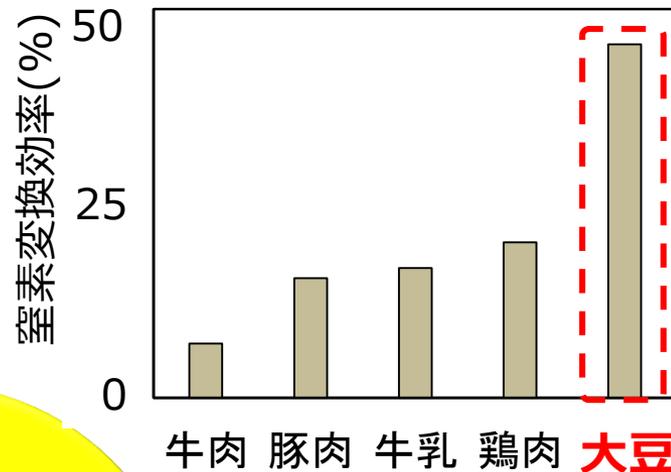
新潟大学 農学部 農学科
流域環境学プログラム
助教 斎藤 嘉人

2023年11月7日

大豆の重要性

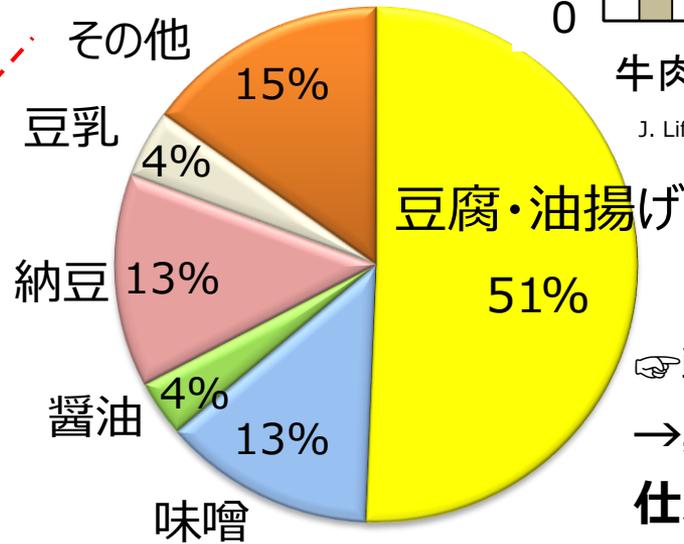
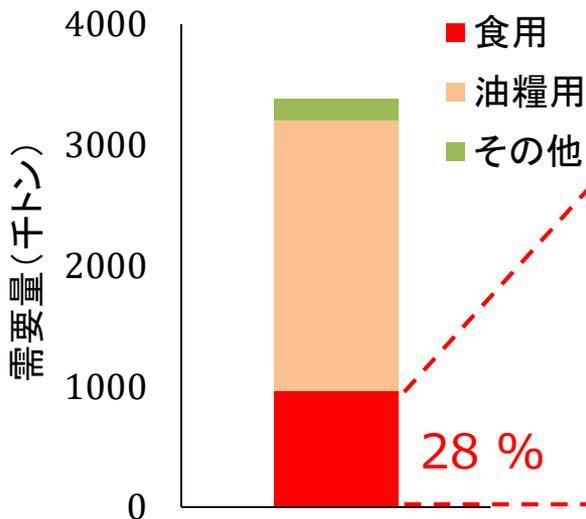
- 大豆：世界的に生産量，需要ともに年々増加傾向
- 食用大豆は基本的に加工され，流通 USDA, 2020
- 品種特性に応じて様々な加工用途

肥料・飼料→タンパク質の変換



J. Life Cycle Assessment, Japan, 14(2), 2018

大豆の用途別需要量(日本)
(平成27年度)



農林水産省, 2017

輸入割合：約80%
→異なる産地の大豆を仕入れる「リスク分散」

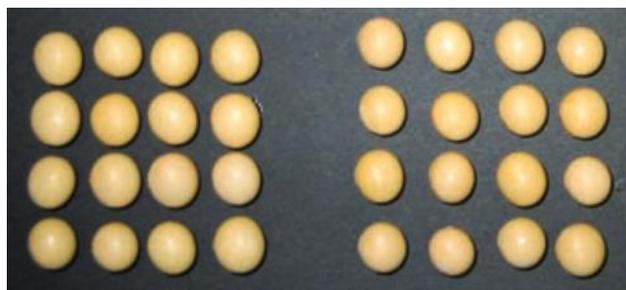
食料需給表, 2020

➡ 種子の品質や加工特性の簡便な計測の必要性

品種例：'里のほほえみ'

■特徴

- ・大粒
- ・高タンパク質
- ・耐倒伏性：○



里のほほえみ

インレイ
(豆腐用)



里のほほえみ

インレイ

東北農研研報, 113,
2011

選抜過程

年次	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
世代	交配	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈	F ₉	F ₁₀	F ₁₁	F ₁₂
供試	系統群数						10	2	2	1	1	1	1
	系統数					37	50	14	14	7	7	7	7
選抜	個体数	112花	7	900	800	1125	×25	×25	×25	×25	×25	×25	×25
	系統数					10	2	2	1	1	1	1	1
選抜	個体数	4莢	3		37	50	14	14	7	7	7	7	15
	粒数	7	900	800	1125								
備考			SMV (C、D系 統) 接種選抜					刈系 703号		東北 160号			

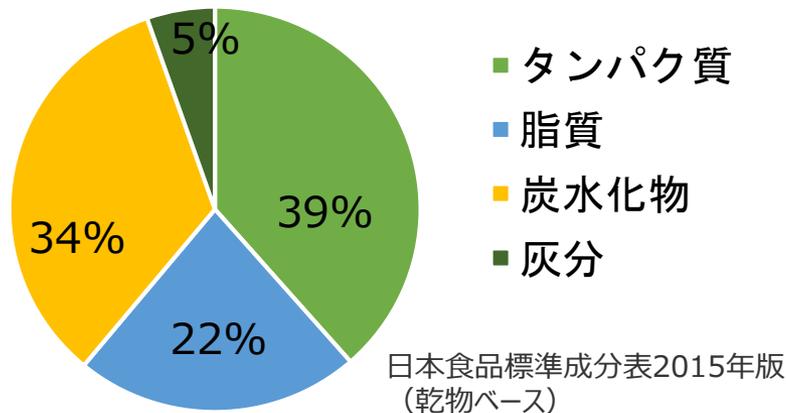
粒単位での
選抜



一粒単位でのスクリーニング技術の必要性

大豆の品質

大豆の栄養成分



■ 主要成分

- ・**タンパク質** → 豆腐用
- ・**脂質** → 味噌用 Liu, K., Springer, 2012

■ その他重要成分

- ・**イソフラボン** : 抗酸化作用, 発がんリスク低減などの機能性 Yan and Spitznagel, Am. J. Clin. Nutr., 2009

先行研究：イソフラボン量の推定

近赤外分光法

- ・非破壊計測の代表手法
- ・イソフラボン量の推定精度
→ $R^2 = 0.80$
- ・測定波長：1000～2500 nm
→ 測定波長帯は広いものの推定可能

Food Chemistry, 317, 126373, 2020.

■ 課題

- ・O-H, C-H, N-Hの倍音, 結合音の重なり
→ 長波長まで測定が必要
- ・タンパク質・脂質より推定精度は劣る
例： $R^2 = 0.89 \sim 0.99$ (タンパク質, 脂質)
→ 微量成分に対する精度を上げたい

KOREAN JOURNAL OF CROP SCIENCE, 46(2), 106-111, 2001

Food Control, 35(1), 227-232, 2014

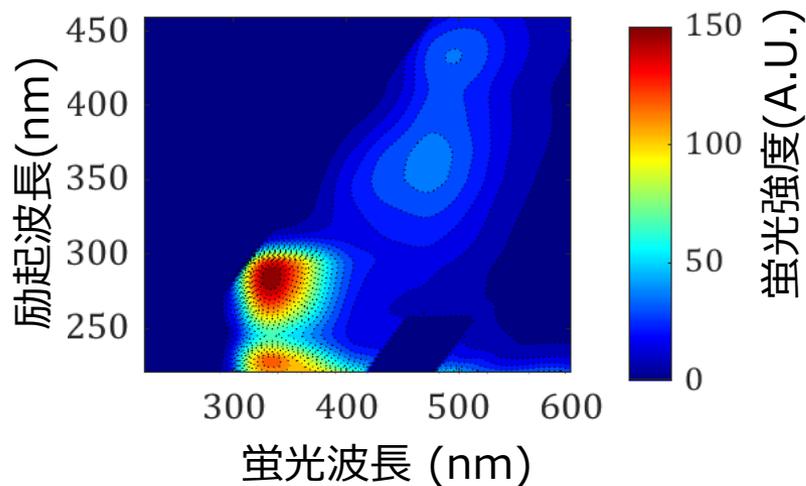
➤ 蛍光分光法

☞ 短波長側で励起→長波長側の発光を計測

☞ 利点

- 蛍光を持つ物質のみが観測される → 選択性：○
- 励起波長， 蛍光波長の組み合わせ → 特異性：○
- 波長選択によりイメージングへ応用 → 装置化：○

☞ 励起蛍光マトリクス (EEM)



- 励起波長， 蛍光波長， 蛍光強度の3次元データ
- 蛍光特性の把握 + 適切な波長選択

大豆に含まれる蛍光物質

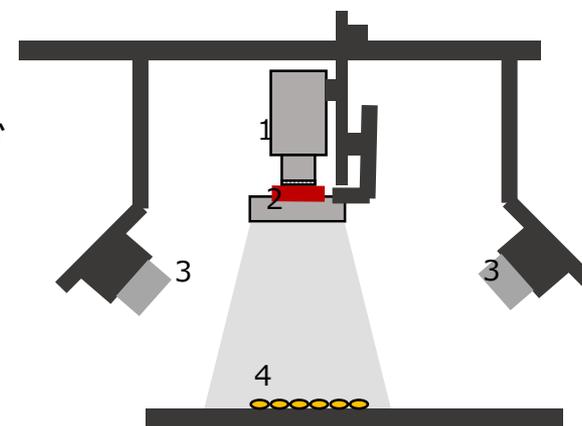
- アミノ酸
- 脂質関連物質
- ビタミンB2
- **イソフラボン**
- メイラード化合物 等



- **単離成分：報告あり**
- **大豆自体：報告なし**

Liang, J.-H., 1999. Food Chemistry 66, 103-108.
Liang, J.-H., Lin, C.-C., 2000. Journal of the American Oil Chemists' Society 77, 709-713.

イメージング
応用



➤ 開発内容

蛍光分光法を利用した 大豆のイソフラボン含有量の簡易推定

■ 新技術の特徴・従来技術との比較

- これまで難しかった，分光法による大豆イソフラボンの高精度な推定に成功した。
- 事前に複数品種の測定を行い検量線を作成すれば，蛍光スペクトルの測定のみでイソフラボン含有量を推定できる。
- 従来の科学的手法（HPLC等）に比べ，化学薬品の利用が不要で，測定時間も1/5以下で完了する。（一試料約15分）

■ 具体的な検証内容

1. 大豆のイソフラボン含有量の定量（HPLCにて測定）
2. 励起蛍光マトリクス，近赤外拡散反射スペクトルの測定
3. 多変量解析によるイソフラボン含有量推定の精度比較

➤ 供試試料

- 大豆：34品種（日本、アメリカ、カナダ、ロシア、中国産）
- 百粒重： $24.2 \pm 8.8\text{g}$
- 含水率： $10.3 \pm 1.5\%$
- 大豆60 gを振動式ミルにて60秒間粉碎し、均一化
- 各種測定まで、 -40°C にて保管



大豆試料60 g



粉碎（1分間）

SAMPLE MILL TI-100 (CMT Co., Ltd, Japan)



→ -40°C にて冷凍保存

1. イソフラボンの測定

菊地ら, 1999. 食品衛生学雑誌 40, 444-454_1.

- ・生大豆粉末を300 μmふるいで夾雑物除去
- ・生大豆粉末を1.0gとなるよう精秤
- ・80%メタノールを5mL添加, 2分間均一に攪拌
- ・6000rpmで5分間遠心分離し, 上清を得る
- ・再度同様の抽出工程を繰り返し, 2回目の上清を得る
- ・1回目・2回目の上清を合わせてHPLCの測定に供試



LC-20ADほか (島津製作所)

<HPLC測定条件>

- ・測定成分：ダイジン, ダイゼイン, ゲニスチン, ゲニステイン (標準液は100%メタで調製)
- ・A相：100mMりん酸ナトリウム緩衝液, B相：90%メタノール
- ・グラジエント条件：
 - 0分(A: 66.7%, B: 33.3%) → 30分(A: 44.4%, B: 55.6%) → 35分(A: 66.7%, B: 33.3%)
- ・流速：1.0mL/min
- ・測定時間：50分
- ・検出器：UV検出 (254 nm)
- ・カラム：Shim-pack VP-ODS 150L-4.6 (島津製作所)
- ・オーブン：40℃

2. EEM・NIR反射スペクトルの測定

・試料：300 μm ふるいを通した生大豆粉約2.0 g



—EEM計測パラメーター

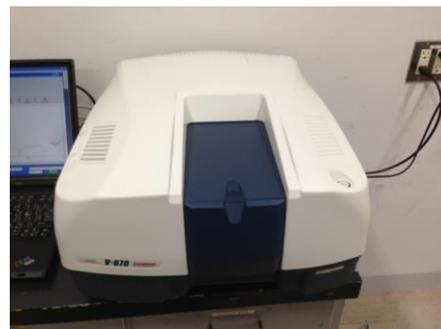
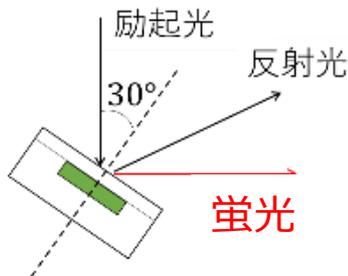
- ・Excitation波長：200-500 nm
- ・Emission波長：220-600 nm
- ・バンド幅：5 nm (Ex, Em)
- ・走査速度：5000 nm/min
- ・Response：50 ms
- ・表面蛍光測定 (Front-Face) により計測
- ・水のラマン散乱積算強度 (Ex.350 nm, Em.371-428 nm) で強度を正規化

—NIR計測パラメーター

- ・波長：800-1800 nm
- ・バンド幅：5.0 nm (UV-Vis), 8.0 nm (NIR)
- ・データ間隔：0.5 nm
- ・積分球ユニット (ISN-923) を使用
- ・リファレンス：各試料ごとにスペクトラロンで測定

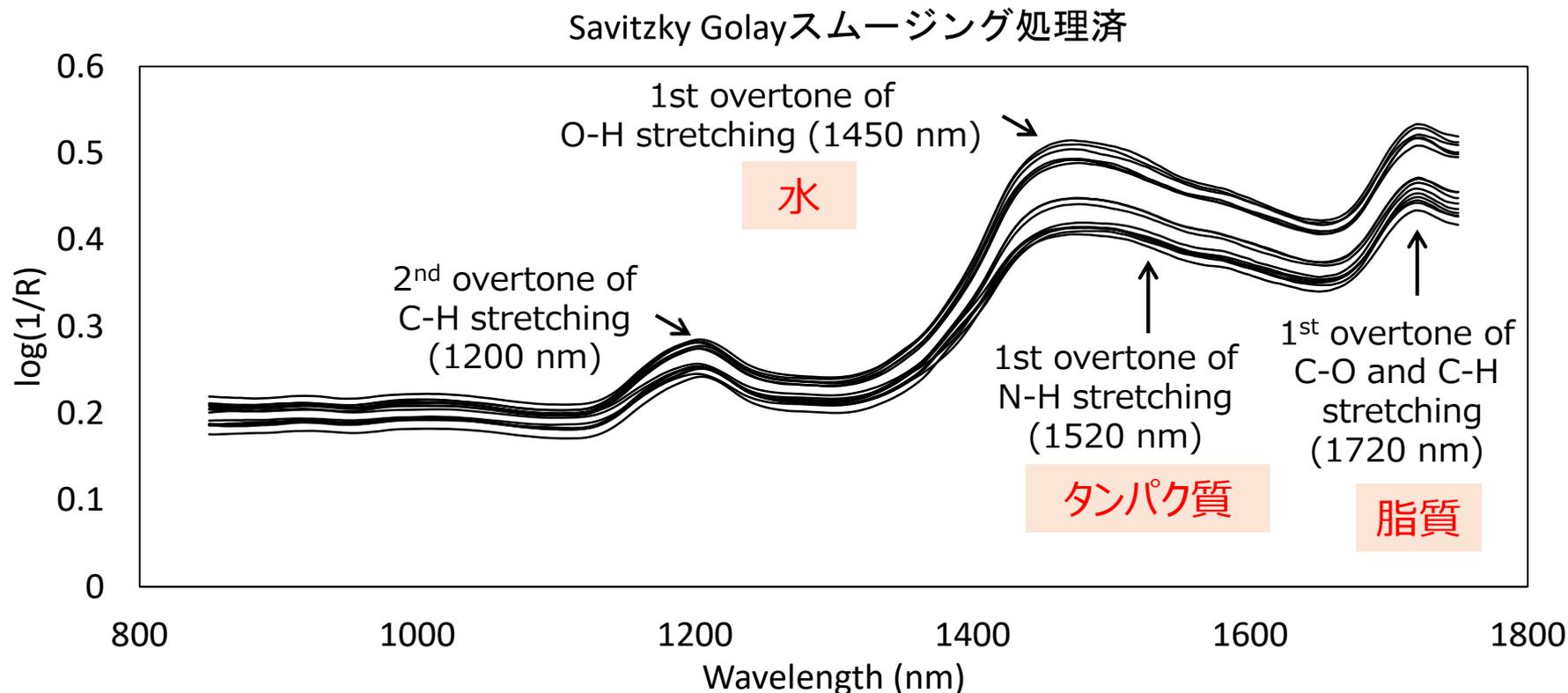


FP8300, 日本分光



V-670, 日本分光

大豆のNIR反射スペクトル

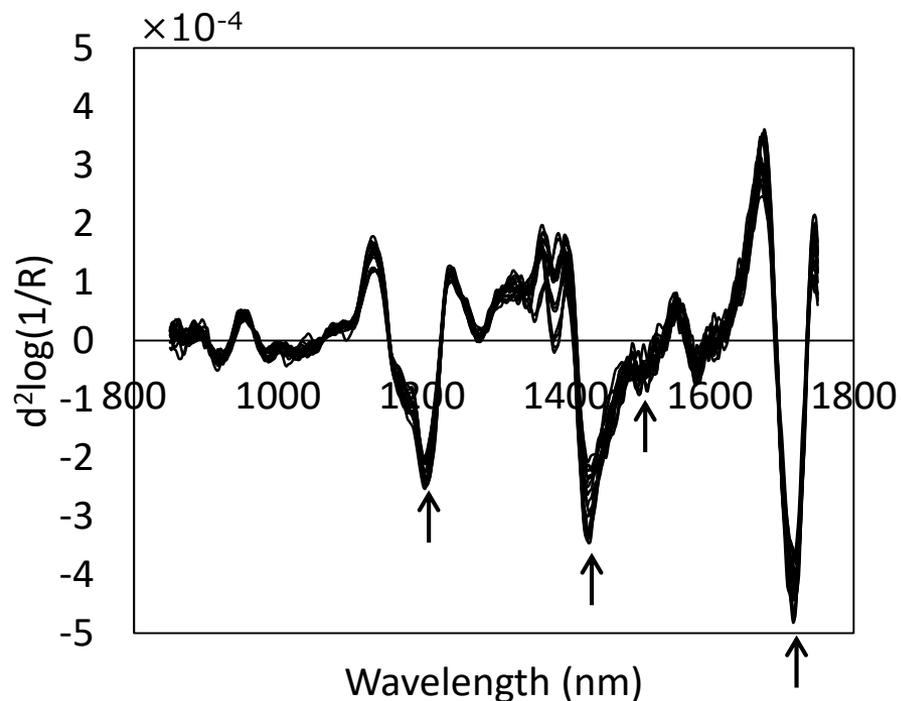


■ PLSR入力前のスペクトル前処理 : 3パターン

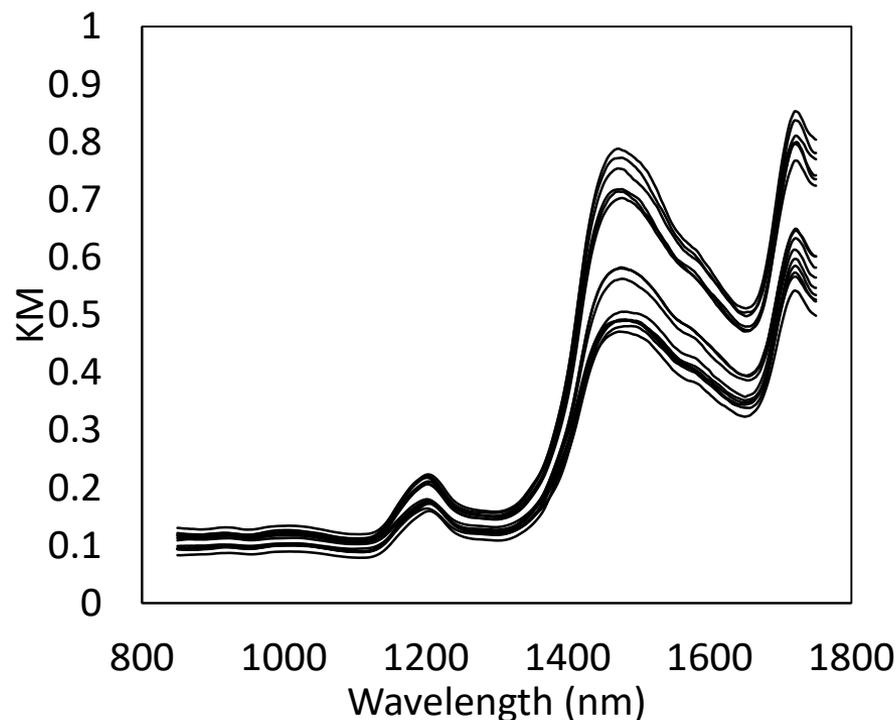
- $\log(1/R)$ (Savitzky Golayスムージング処理済, 窓サイズ25)
- $\log(1/R)$ の2次微分スペクトル : $d^2\log(1/R)$
- 反射率をKubelka-Munk変換したスペクトル : $KM=(1-R^2)/2R$

大豆のNIR反射スペクトル

■ $\log(1/R)$ の2次微分スペクトル



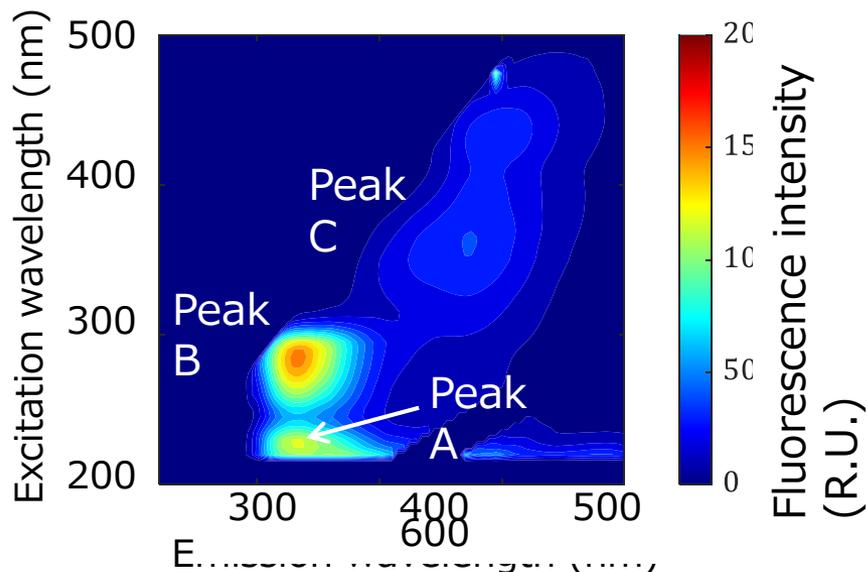
■ Kubelka-Munk変換後スペクトル



■ PLSRによる推定モデルの構築

- ・目的変数：イソフラボン総量
- ・交差検証：5分割交差検証
- ・潜在変数：5分割交差検証でRMSEが最小値となった個数

大豆のEEM



No.	Ex [nm]	Em [nm]	想定される蛍光物質
A	230	335	アミノ酸 ^[1]
B	285	335	アミノ酸 ^[1]
C	365~	475~	脂質酸化物
	435	495	メイラード化合物 ^[2] イソフラボン類 ^[3]

[1] Yamashita & Tanoue, Marine Chemistry, 82(3-4), 255-271, 2003

[2] Sun & Leopold, Physiologia Plantarum 94, 94-104, 1995

[3] Chaudhuri et al., Current drug metabolism 14, 491-503, 2013

■ PLSR入力前のスペクトル前処理

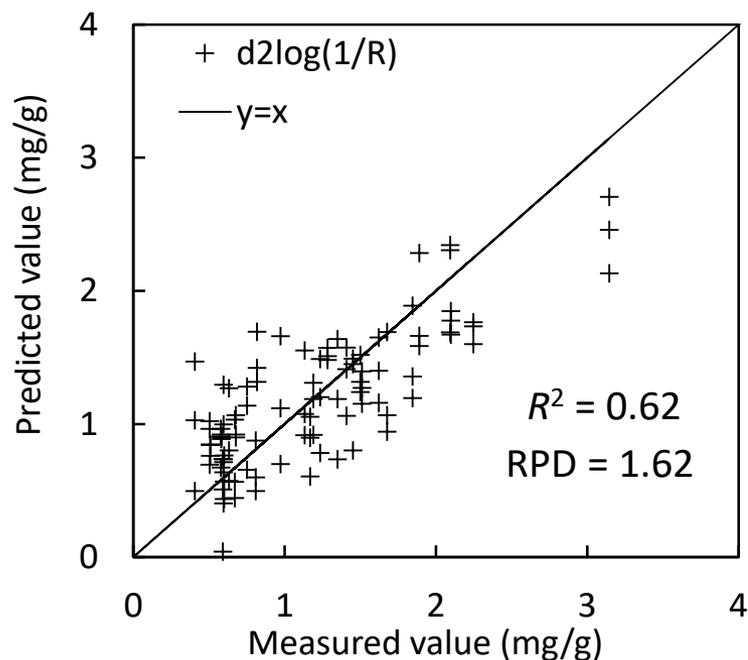
- 全ての(Ex, Em)波長組み合わせを1次元にunfold

■ PLSRで推定モデルを構築

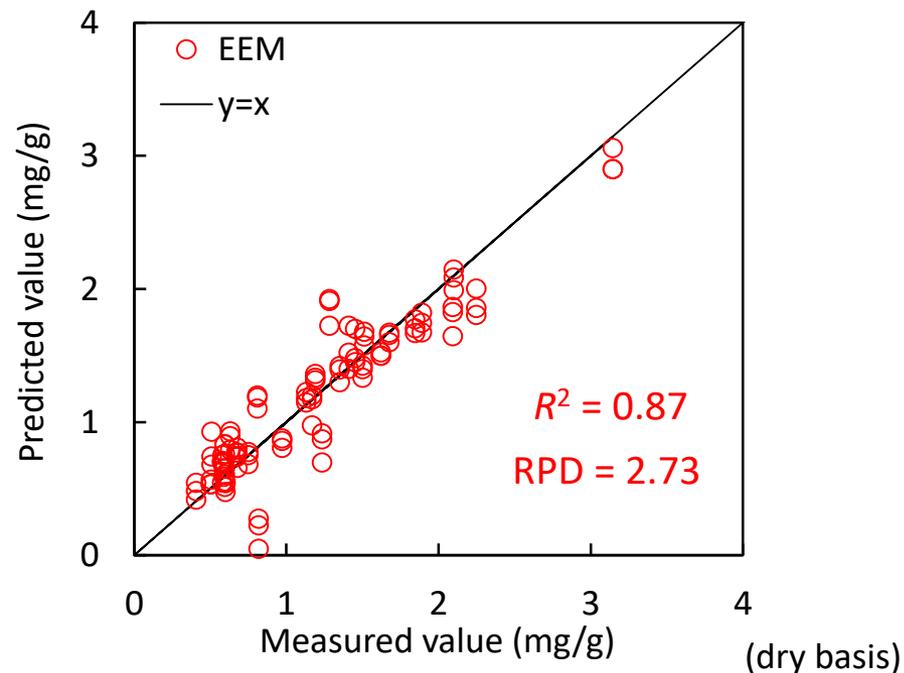
- 目的変数：イソフラボン総量
- 交差検証：5分割交差検証
- 潜在変数：5分割交差検証でRMSEが最小値となった個数

➤ PLS回帰の結果：総イソフラボン含量の推定

■ $\log(1/R)$ の2次微分スペクトル



■ EEM

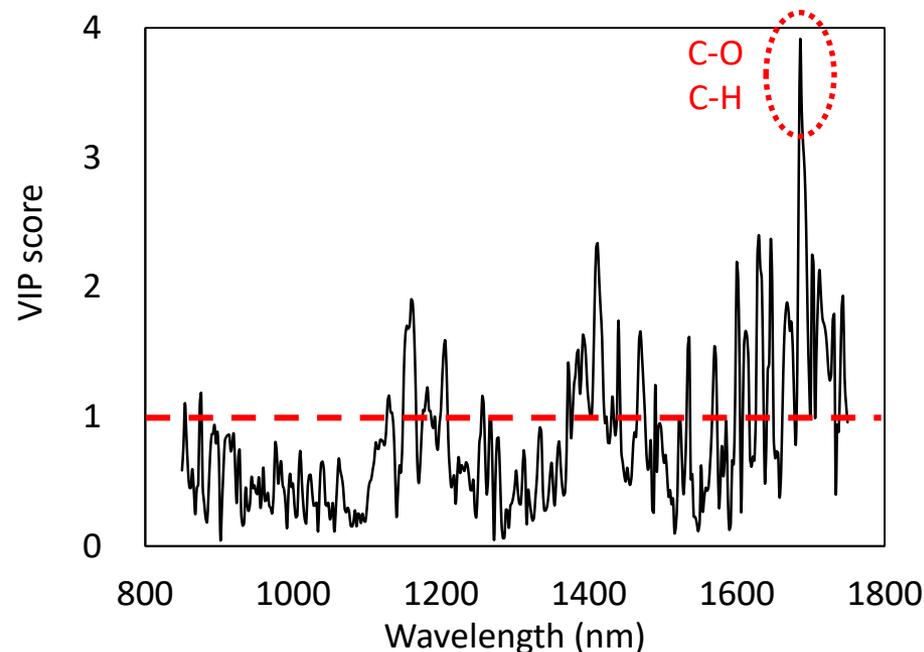


■ 考察

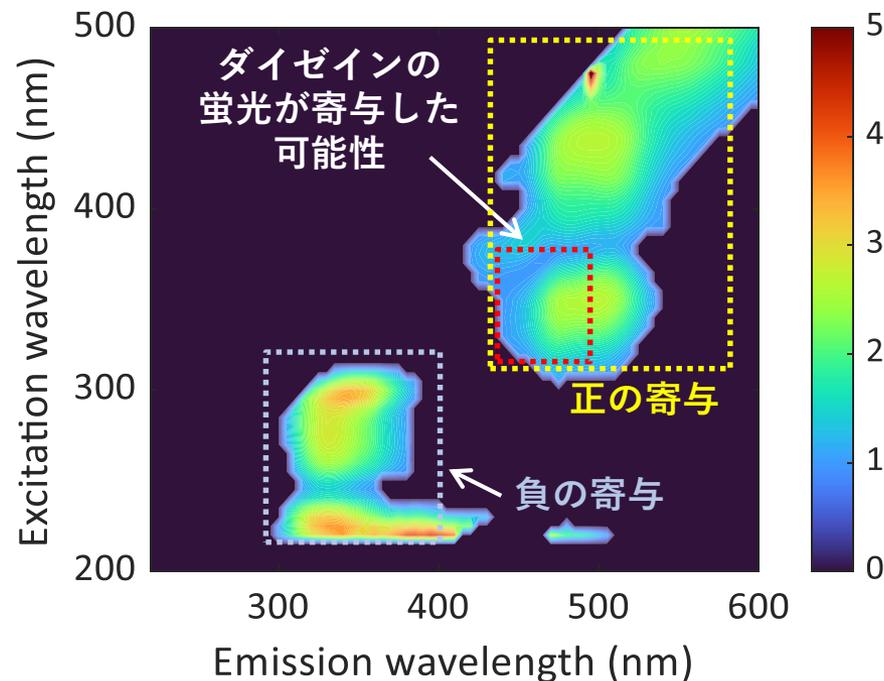
- ・ NIRでは二次微分処理により推定精度が改善 (RPD = 1.62)
- ・ $\log(1/R)$ とKMではRPDが1.1程度と推定不可能
- ・ EEMでは高精度な推定が可能, スクリーニングにも適用可能 (RPD = 2.73)

➤ 推定に寄与した波長の考察：VIPの可視化

■ $d^2\log(1/R)$

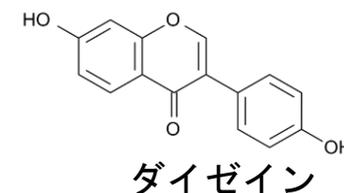


■ EEM ※VIP>1.0のみ表示



■ 考察

- ・ C-OやC-H：イソフラボンにも含まれる官能基
ただし脂質由来が支配的（脂質20%，イソフラボン0.1%／大豆中）
- ・ EEM：ダイゼインの蛍光（Ex:300-350, Em: 465 nm）が寄与した可能性
ただし他の蛍光物質も影響している可能性



➤ 研究目的

大豆のイソフラボン含有量の推定における 蛍光分光法と近赤外分光法の比較

➤ 結果

■ 近赤外分光法

- ・ 二次微分により精度が改善（RPDで1.6）
- ・ 脂質由来の情報(C-O, C-H)に埋もれ選択的な推定が難しい可能性

■ 蛍光分光法

- ・ **RPDで2.7**を超える推定精度
- ・ 蛍光波長450 nm以上の領域が正に寄与

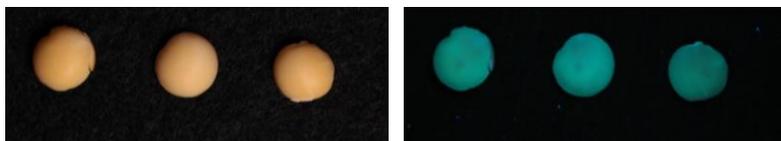
蛍光分光法を用いた大豆のイソフラボン量推定の可能性



種子の迅速スクリーニング



色彩選別機への組み込み



貯蔵中の種子品質のモニタリング

加工前の“オンサイト”品質検査

■ 利用者

- ・大豆の育種者
- ・大豆商社

・大豆加工メーカー（豆腐・味噌・豆乳・醤油・納豆等）



■ハードウェアの課題

- EEM全体を入力とすることで、実用に足る精度は得られている (RPD = 2.73)。一方、EEMの取得のためには、励起波長・蛍光波長を両方とも走査できる**分光蛍光光度計**が必要。

⇒一農家が導入できる価格帯ではない (最低100万円～)

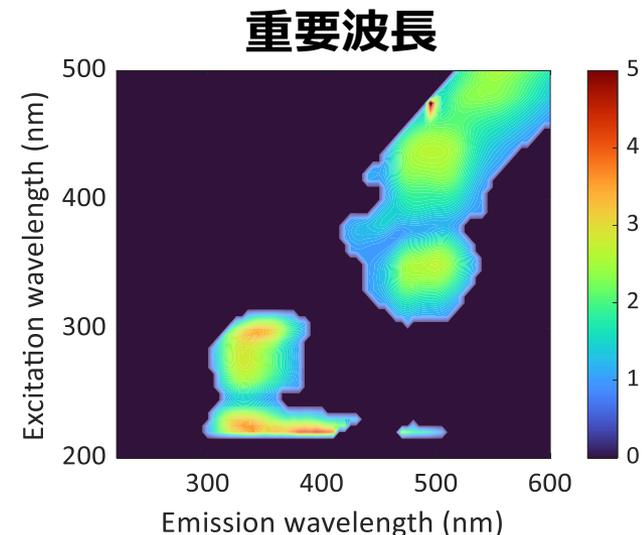
- EEMを用いない方法として、**励起波長固定型・蛍光スペクトル走査型の簡易光学系**が考えられる (つまり、重要波長のみに絞る)

- 励起波長固定型の光学デザインについては今後検証する必要がある

■ソフトウェアの課題

- **励起波長固定型**を想定したときの精度

⇒今後検証する必要がある



- ・励起波長固定型・蛍光スペクトル走査型の簡易光学系について紫外LEDや小型分光器，ファイバなどの装置開発メーカー，あるいは農機メーカーとの協業で開発できる可能性がある。
- ・別の農作物や食品，医薬品など，別の対象物への応用可能性についても連携を期待する。
(特に社会的インパクトの大きい研究・開発)

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 :
豆含有イソフラボン量の推定方法、及び豆含有イソフラボン量推定装置
- 出願番号 : 特願2023-140758
- 出願人 : 新潟大学
- 発明者 : 斎藤嘉人

共同研究先企業・機関

2020年-2023年

地方公共団体及び民間企業等

外部資金等獲得状況

2020年-2023年

[1] 科研費：代表3件，分担1件

特別研究員奨励費DC2（代表，2020-04-01～2022-03-31）

科研費研究活動スタート支援（代表，2022-08-01～2024-03-31）

科研費挑戦的研究(萌芽)（分担，2022-06-30～2025-03-31）

科研費若手研究（代表，2023-04-01～2025-03-31）

[2] 公的競争的資金：代表1件

NEDO官民による若手研究者発掘事業（代表，2022-10-01～2025-03-31）

お問い合わせ先

新潟大学 社会連携推進機構

T E L 025-262-7554

F A X 025-262-7513

e-mail onestop@adm.niigata-u.ac.jp