



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Development of a characterization method for food-related bacteria using Raman spectroscopy and machine learning [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	山本, 貴志
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14810号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/85515">https://hdl.handle.net/2115/85515</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Yamamoto_Takashi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



# 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称： 博士（農学）

氏名 山本 貴志

## 学位論文題名

### **Development of a characterization method for food-related bacteria using Raman spectroscopy and machine learning**

（ラマン分光法と機械学習による食品関連細菌の特性評価手法の開発）

細菌による食中毒や食品の品質低下を防ぐために、食品中にどのような細菌が存在するかを把握することが重要である。細菌の種類が分かれば、食中毒リスクの推定や食品の品質保持のためにどのような対策をすればよいか考える手掛かりとなる。細菌を同定する手法として、16S rRNA などの所定の遺伝子領域を解析する方法が一般的であるが、DNA 抽出といった煩雑な技術操作や知識が必要である。そのため、細菌の種類や特性を迅速かつ容易に評価する手段が求められている。ラマン分光法と機械学習との組み合わせによる細菌の迅速同定手法が新たに注目されている。本研究では、ラマン分光法と機械学習の組み合わせにより、食品安全や品質保持に有用なストレス耐性や増殖挙動といった細菌の特性を迅速に評価可能とする手法の開発を行なった。

#### **1. ラマン分光法と機械学習を用いた食品腐敗細菌の菌種および食品添加物への耐性の分類手法の検討**

ラマン分光法は、光の散乱をもとに測定対象物の分子振動を測定する手段として知られている。近年、ラマンスペクトルが試薬や複雑な前処理無しで微生物の識別が可能な手段であることが報告されている。しかし、食品添加物への耐性や食品中での増殖挙動など、食品中の微生物の制御に有用な微生物の特性評価にラマン分光法を利用した報告は無い。本研究では、ラマン分光法と機械学習を組み合わせることで、細菌の増殖に影響するストレス耐性を迅速に評価する手法を検討した。

レーザーラマン顕微鏡を用いて、6種類の食品関連細菌のラマンスペクトルを取得した。各細菌を NaCl, 酢酸ナトリウムまたはグリシンを添加した液体培地に接種して培養し、増殖/非増殖を濁度法により各ストレスへの耐性を確認後、耐性別にグルーピングした。得られた細菌のラマンスペクトル情報とストレス耐性別のグループ情報を用いて、サポートベクターマシンによる分類モデルを構築した。分類モデルは、細菌のストレス耐性のグループを約90%

の精度で分類することができた。ラマンスペクトルと機械学習を用いることで、食品中に存在する細菌の増殖に影響するストレスへの耐性を評価可能であるという知見が得られた。本技術は、食品の腐敗防止を目的とした食品中の添加物量の効率的な決定への利用が期待できる。

## 2. ラマンスペクトル情報を利用した食品中の未知の細菌株の増殖挙動予測

食品の安全性や品質保証のための製造や保存条件の設定を効率的にする手段として、微生物増殖挙動の予測モデルが利用されている。食品微生物学における統計モデルや機械学習モデルは、食品の製造や保存条件が食品中の微生物増殖挙動に与える影響を定量的に評価可能にするためである。一方、予測モデルを利用する場合にも、食品に存在する微生物の同定が必要となる。さらに、同定結果が同種の細菌であっても菌株ごとに増殖挙動が異なる場合もあり、食品から検出された未知の細菌の増殖挙動予測は課題の一つとなっている。本研究では、細菌のラマンスペクトル情報を利用し、未知の細菌の増殖挙動を予測する機械学習モデルの開発を検討した。

市販のカット野菜から 21 菌株の細菌を単離し、ラマンスペクトルを測定した。各菌株の増殖挙動は、異なる酢酸ナトリウム濃度の液体培地に細菌を接種し、培養温度および培養時間別の増殖/非増殖を濁度法で評価した。ラマンスペクトル情報および増殖挙動の情報を機械学習のニューラルネットワークモデルに学習させ、学習に使用しなかった菌株を未知の菌株として、増殖/非増殖が予測可能か評価した。その結果、本章で開発した機械学習モデルは未知の菌株の増殖挙動を約 90%の精度で予測することができた。本技術は、未知の細菌が検出される可能性が高い食品分野において、ラマンスペクトルを測定するだけで、その制御方法を効率的に検証することを可能にする技術として利用が期待できる。

以上、本研究では細菌による食中毒や腐敗による食品の品質低下防止のため、迅速かつ効率的に食品の製造や保存条件の設定に有用な細菌の特性評価手法の確立を目指して、細菌の食品添加物への耐性や様々な環境下での増殖挙動などの特性評価にラマン分光法が利用可能か検討した。その結果、食品中の細菌を単離し、ラマンスペクトルを測定するだけで、細菌の添加物のストレス耐性ごとに分類するだけでなく、未知の菌株の増殖挙動特性を予測できる可能性が示された。