蛍光分光法を利用した製麹工程モニタリング技術の開発

製麹工程のモニタリングに前処理の必要がなく、高感度な非破壊試験法の紹介である。蛍光強度の増加が何に由来するか等、今後の研究が待たれるが、モニタリングには有効な手法であり、汎用性の高い測定装置の普及を望みたい。

佐々木隆浩¹・齋藤高弘²

1. はじめに

清酒製造過程において従来から「一麹、二酛、三造り」と言われているように、製麹（麹造り）工程は酒質に大きく影響を与える最も重要な工程と知られている。しかし、米麹は蒸米に麹菌を生育させた固体培養物であり麹の品質評価が困難なため、多くの清酒製造場は本工程の管理を経験豊富な酒造技術者の主観的な評価（外観、手触り、香味など）に依存しており、製造現場では客観的な評価管理法の開発が求められている。これまでに用いられている評価法としては麹菌細胞溶解酵素を用いた米麹の菌体量の測定法¹⁾、近赤外分光分析法による米麹中の菌体量の測定²⁾米麹の酵素活性の測定法^{3)~6)}などが開発されている。しかし、菌体量や酵素活性の測定は分析作業が煩雑で2~7時間程度の時間を要し、分析機器が高額なため清酒製造現場での分析法として広く普及していない。

これまで我々は微弱発光や化学発光を応用することで、清酒の熟成や劣化の変化を網羅的、客観的かつ簡易で迅速な評価手法として清酒製造現場に適応可能かどうか検討を行ってきた^{7)~9)}。微弱発光法とは反応系の分子を励起し、基底状態に移る際に光を放つ現象を計測する事で、物質の微妙な変化の情報を得る手法¹⁰⁾である。食品分野に関しては、焙煎ゴマ油の保存に伴う品質劣化判定¹¹⁾、米の品質劣化の評価¹²⁾、牛乳中大腸菌群の検出¹³⁾、などに利用されており、それぞれ既

存の手法に比べ簡便で迅速な測定を可能としている。しかし、山口らの微弱発光法⁷⁾では発光量が少なく測定値が不安定であり、化学発光は試薬添加の煩雑性や測定に1時間程度必要なため酒造製造現場での定着には難しいと考えられる。

そこで本研究では光を照射することで反応系の分子を励起する手法である蛍光分光法¹⁰⁾に着目した。本手法では試薬の添加や前処理が不要であり高感度、非破壊的で、また測定時間が数分間と短時間なため簡便・迅速な測定が可能であり、測定対象から多くの情報検出が可能で製麹現場での利用が期待できる。

本稿では、筆者らが取り組んできた蛍光分光法を用いて製麹工程における変化を簡易にモニタリングすることにより、麹菌活性や生産する代謝生産物を網羅的に捕らえこれまで経験則に依存してきた工程を数値化する検討を行ったので解説する。

2. 励起波長および測定波長の検討

蛍光分光法は対象からの発光の大部分を占める蛍光・りん光を捉えるため、物質の状態を反映する多くの情報が得られ、適用の範囲が広いことが特徴である。蛍光分光法の測定原理を第1図に示す。米麹の測定には蛍光プレートリーダー（TECAN社）を使用し、岡崎¹⁴⁾の標準製麹試験法に準じてシャーレにて培養し試験に供した。またシャーレからマイクロプレートに試料を移動する際に米麹が破損し蛍光強度が変化する

Development of Monitoring Technology in Koji Making by Fluorescence Spectroscopy

¹Takahiro SASAKI (Industrial Technology Center of Tochigi Prefecture),

²Takahiro SAITO (Utsunomiya University)

第1図 蛍光分光法の測定原理

0h → 26h → 36h

第2図 96穴マイクロプレートにて培養した麹 (α 米(吟風, 精米歩合 60%)5gが入ったシャーレ(直径 9cm)に, 麹菌の胞子を 10^5 個 / ml に調整した胞子けん濁水 7.5ml を加え混合した。種麹は市販の醪用麹を用い, 温度 36℃, 湿度 90%以上の恒温庫にて培養した)

ことを防ぐため, マイクロプレートのウェル内にて前述の条件にて培養した米麹も試験に供した(第2図)。はじめに培養 48 時間の蒸米と米麹について励起波長 365, 400, 425, 450nm にて蛍光強度の測定を行った。

励起波長 425nm における蒸米と米麹の蛍光スペクトルを第3図に示す。その結果, 蒸米と米麹についていずれの励起波長においても測定波長 500nm 付近で蛍光強度は最大値を示しその後緩やかに減少する傾向を示したが, 米麹のみ励起波長 400, 425nm において測定波長 630, 690nm 付近で蛍光強度の増加が認められた。

そこで, この特異的な蛍光強度の増加を調べるこ

第3図 励起波長 425nm における蒸米と米麹の蛍光スペクトル

第4図 励起波長 400-426nm における測定波長 630nm の米麹の蛍光スペクトル

により麹菌に関する何らかの情報が得られると考え, より蛍光強度の増加が大きかった 630nm を測定波長として固定し測定に最適な励起波長の検討を行った。培養 48 時間の米麹について励起波長 400 ~ 426nm における蛍光スペクトルを第4図に示す。励起波長 410nm における蛍光強度が最大値を示したことから, 以後は励起波長 410nm, 測定波長 630nm にて米麹の測定を行うこととした。また, シャーレで培養した米麹よりもマイクロプレートにて培養した米麹のほうが蛍光強度のばらつきが少なかったため, 米麹の蛍光強

度の測定にはマイクロプレートにて培養した米麴を測定した。

3. 米麴の蛍光強度の経時変化

麹菌の生育状況と蛍光強度との関係を検討するためにマイクロプレートにて培養時間の異なる米麴を製造し、蛍光強度を測定した。培養0, 12, 30, 48時間の米麴とポテトデキストロース培地（日水製薬社）に麹の孢子けん濁水を添加し0, 6, 12, 18時間培養した麹について励起波長410nm, 測定波長630nmにて測定した。その結果、培養0, 12時間の米麴では蛍光強度に変化は見られなかったが、培養30, 48時間の米麴において蛍光強度の増加が認められた（第5図）。また、培地で培養した麹についても培養18時間において同様の蛍光強度の増加が認められ、麹菌が生育するにつれ蛍光強度が増加することが示唆された。また、培養48時間の米麴に2.66WのUVを10秒間照射し殺菌処理を行うことで麹菌と蛍光強度との関係について検討を行った。殺菌処理の有無における米麴の蛍光スペクトルを第6図に示す。殺菌することにより米麴に特異的であった測定波長630, 690nmにおける蛍光強度のピークは消失した。これにより測定波長630, 690nmにおける値は、生きた麹菌の何らかの情報をとらえていることが示唆された。なお、殺菌処理後の米麴を培地に移し培養試験を行ったが、麹菌の生育は確認されず殺菌処理が確実に行われていることが確認

第5図 培養時間の異なる米麴の蛍光スペクトル

第6図 殺菌処理の有無における米麴の蛍光スペクトルの比較

第7図 蒸米と米麴の蛍光強度の経時変化

された。

またマイクロプレートで培養した蒸米と米麴について蛍光強度の経時変化を測定した（第7図）。米麴の蛍光強度は培養20～40時間の間で急激に増加し、その後はほぼ一定の値を示した。一方蒸米は培養時間が長くなるにつれ蛍光強度は微増したが、米麴と比べ大きな変化は認められなかった。一般的に米麴では培養20時間程度（盛り）から麹菌の生育が旺盛になるので、蛍光強度の増加は麹菌の生育に関係することが示唆された。

4. 米麴の蛍光強度と酵素力価および菌体量の分析

米麴の蛍光強度と酵素力価および菌体量との関係を検討するため、シャーレで製造した麹について酵素力

第8図 (A) 蛍光強度と麹菌体量 (B) 酵素力価

価分析として α -アミラーゼ活性、グルコアミラーゼ活性と菌体量の分析を行った。各酵素活性の測定には α -アミラーゼ測定キット、糖化力分別定量キット(KIKKOMAN)を使用し、麹菌体量の測定は五味ら¹⁾の報告に従い、麹菌細胞溶解酵素(Yatalase)を用いて得られたN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)量から麹菌体量(mg/g 麹)を算出した。

麹の蛍光強度と麹菌体量、酵素力価の関係をそれぞれ第8図(A)、(B)に示す。蛍光強度と麹菌体量は培養時間が長くなるに従い値の増加が認められほぼ同様の傾向を示した。本測定法は主に米麹表面のからの蛍光を捉えていると思われるため、得られた数値は麹菌のハゼ廻りに関する情報であると考えている。麹菌の生産する α -アミラーゼ、グルコアミラーゼについては、麹菌の生育が盛んになる盛りの時間帯(培養23時間)から液化酵素である α -アミラーゼの生産が盛んになり、遅れて糖化酵素であるグルコアミラーゼの生産が確認された。仲仕事の時間帯(培養32時間)から酵素の生産が急激に増加し出麹前(培養44時間)には緩やかとなった。

第9図 種麹使用量が異なる米麹の蛍光スペクトル

5. 現場レベルでの製麹工程モニタリング

これまではマイクロプレートやシャーレによる製麹であったため、現場レベルの製麹工程モニタリング試験を当センターの麹室にて行い箱麹法により行った。原料米は精米歩合50%の本県産ひとごちを用い、種麹は市販のひかみ吟醸用を用いて白米100kg当たり10g及び100g使用し種麹使用量の異なる米麹を製造した。多くの製麹現場において種麹使用量はおよそこの範囲内であるため蛍光強度の変化もこの範囲内であると考えられる。

種麹使用量が異なる米麹における蛍光強度の経時変化を第9図に示す。種麹10g、100gともに製麹時間が長くなるに従い蛍光強度は高い値を示したが、種麹10gの蛍光強度について製麹時間36時間(仕舞仕事)以降は緩やかな増加となり、種麹使用量の異なる麹は異なった挙動を示した。製麹時間45時間の蛍光強度は種麹100gは種麹10gの約1.7倍であり、これは種麹の使用量が10倍多く菌体量が多かったためであると推察された。以上のことから蛍光分光法を利用することで製麹時の麹菌の生育状況や生産酵素のモニタリングが可能であることが示された。

6. おわりに

本稿では蛍光分光法を用いて経験豊富な酒造技術者の主観的な評価に依存している製麹工程についてモニタリングを行った。本手法は試薬の添加や前処理が不要で、測定時間が数分間と極めて短時間なため簡便・迅速な測定が可能であり現場での利用が期待できる。一方で、測定装置である蛍光プレートリーダーは安価であるとは言えず、また本手法のさらなる確認試験が

必要であると考えられるため、まだまだ普及に時間がかかることが予想される。しかし、杜氏など熟練した技術者の減少により清酒製造現場では望まれている手法であると思われるため、今後はこのような客観的な評価法を用い主観的な清酒製造工程の一部を補完することで伝統的な清酒製造の一助になれば幸いと考えている。

(¹) 栃木県産業技術センター, (²) 宇都宮大学)

参考文献

- 1) 五味勝也, 岡崎直人, 田中利雄, 熊谷知栄子, 井上博, 飯村稔, 原昌道: 醸協, **82**, (2), 130-133 (1987)
- 2) 荒巻功, 福田賢一, 橋本寿之, 石川朝章, 木崎康造, 岡崎直人: 生物工学, **73**, 33 (1995)
- 3) 堀江修二, 土佐典照, 細谷達夫: 醸協, **87**, (1), 57 ~ 61 (1992)
- 4) 白兼孝雄, 徳武昌一, 戸辺光一郎, 鈴木勝: 醸協, **91**, (12), 889-894 (1996)
- 5) 今井泰彦, 徳武昌一, 山次信幸, 鈴木勝: 醸協, **91**, (1), 51 ~ 57 (1996)
- 6) 鈴木英之, 今井泰彦, 鈴木勝: 醸協, **94**, (7), 588 ~ 592 (1999)
- 7) 山口貴之, 齋藤高弘, 岡本竹己, 佐々木隆浩, 杉江正美, 蘓原昌司, 志賀徹: 醸協, **104**, (4), 303-311 (2009)
- 8) 片岡皆人, 齋藤高弘, 岡本竹己, 佐々木隆浩, 星佳宏, 杉江正美, 蘓原昌司, 志賀徹: 醸協, **106**, (9), 620-626 (2011)
- 9) 阿部恭幸, 齋藤高弘, 岡本竹己, 佐々木隆浩, 星佳宏, 杉江正美, 蘓原昌司, 志賀徹: 醸協, **107**, (9), 693-698 (2012)
- 10) 大澤善次郎: ケミルミネッセンスー化学発光の基礎・応用事例ー (丸善株式会社, 東京), (2003)
- 11) 蘓原昌司, 元下伸二, 関圭吾, 齋藤高弘, 志賀徹, 大谷敏郎: 日本食品化学工学会誌, **50**, (7), 303-309 (2003)
- 12) 齋藤高弘, 蘓原昌司, 野口良造, 志賀徹: 生態工学会誌, **19**, (2), 103-109 (2007)
- 13) 川崎晋, 山庄司志朗, 浅川篤, 川崎友美, 田中孝, 上門英明, 川本伸一: 日本食品科学工学会誌, **54**, (5), 209-214 (2007)
- 14) 岡崎直人: 醸協, **74**, (11), 738-739 (1979)