近赤外分光分析 (NIR) 法による米麴中の菌体量の測定

非破壊かつ迅速な測定を特徴とする利用範囲の広い近赤外分光分析法による麴菌体量直接測定の原理及びオンライン測定によるその製麴管理への応用について、NIR 法に詳しい著者に解説していただいた。

荒 卷 功

は じ め に

現在、近赤外分光分析法（以下「NIR 法」と略す。）は、農業や食品の分野にとどまらず、石油精製、石油化学、薬品・製薬、繊維、医療の分野、さらには細菌の同定¹⁾や蛋白質の2次構造の解析^{2,3)}などにその利用・応用範囲は大きく広がっている。特にプロセスモニタリングにおいては、NIR 法の特徴である非破壊、迅速、多成分同時測定などの特徴を生かし、その利用が著しく進んでいる⁴⁾。つまり、清酒の製造工程でも同様であるが、これまで従来のプラントの管理では温度、圧力、流量などの物理的なプロセスパラメータを頼りにしていた。しかし、これらのパラメータは、製品の品質とは間接的な関係にあるものの一つの指標であるにすぎず、直接製品の成分や品質をモニタリングしているわけではない。

清酒製造工程においては昔から「一麴、二酛、三造り」と言われており、麴の製造工程が最も重要とされている。しかし、麴は蒸米に麴菌を増殖させた固体培養物であり、機器によりその菌体量を直接測定することはできないため、工程の管理は専ら杜氏等の長年の経験と熟練による視覚、香味、触感等の官能評価によって行われているのが現状である。製麴工程を機械化した自動製麴機も開発されているが、先に述べたように単純に時間と温度・湿度による管理であり、清酒麴の製造管理で最も重要である状ボウ（菌体量の増殖程度）による管理は行われていない。

そこで本稿では、麴菌の増殖に関し、リアルタイムで、かつ非熟練者でも管理が可能で官能評価に代わる指標として、麴を粒状のまま NIR 法により麴菌体量を測定する方法⁵⁾について解説する。

なお、NIR 法のこれまでの歴史、原理、食品、農業分野での利用、また、清酒製造や醤油製造への利用については、本誌において若井⁶⁾や橋本⁷⁾の詳しい解説があるのでこれを参考にさせていただきたい。

1. これまでの麴菌体量の測定

これまでの麴菌体量の測定法に関しては、菌体細胞壁の構成成分である Chitin を酸分解して得られる Glucosamine を定量する方法^{8)~13)}、細胞壁溶解酵素を用いて N-Acetyl-D-Glucosamine を定量する方法^{14)~16)}が報告されているが、いずれもかなりの時間と労力をため、現場の工程管理に利用することはできない。また、麴菌の酸素消費量をモニターして、オンラインで測定する方法^{17)~20)}もあるが、設備を密閉しなければならないと実際への利用は困難であった。

NIR 法による麴の菌体量の測定については、試料の粒度による測定のばらつきをなくすため、これまで麴をアルコールで乾燥、粉碎し測定する方法^{21),22)}、また、乾燥、粉碎方法を改良し、所要時間が30分程度で麴菌増殖のモニタリングが可能である²³⁾ことが報告されている。粒状のままでの測定についても一部検討されたが、乾燥を伴うことや、測定セルが小さく粒径の影響を大きく受けるため再現性に乏しかった。

Estimation of Mycelial Weight in Rice *Koji* by Near Infrared Reflectance Spectroscopy
Isao ARAMAKI (National Research Institute of Brewing)

2. NIR スペクトルの測定装置

麹菌の増殖をリアルタイムで測定するには乾燥、粉碎などの操作を省く必要がある。そこで、粒状のまま簡便迅速に麹中の菌体量を測定するために、可動式の大型セル（以下「粒状サンプルセル」と略す。）を用いることができる NIR Systems Model 6500 型（株）ニレコ（写真 1）を用い、1,100～2,500 nm の範囲で、2 nm ごとに拡散反射スペクトルを測定した。

ここで用いた粒状サンプルセル（写真 2）は、粒径が 1～3 mm の穀物、錠剤などを充填、測定を行うことができ、麹試料では約 100 g 程度を充填する。また、測定面積も標準セルの 3 cm² に比べ 50 cm² と格段に大きい。粒状サンプルセルは装置に垂直に装着され、検出器の窓に沿って上下に移動する。これは、サンプリングや試料の粒径により生じる吸光度のばらつきを軽減する

写真 1 NIR 近赤外分光装置 (NIR System 6500)

写真 2 粒状サンプルセル

ため、1 分間に 30～50 回のスキャンを行うことができる。

なお、近赤外分光装置は、NIR 法の普及とともに多くの機種が出されており、粒状のまま分析できる装置も多くなっている。

3. NIR 法による検量線の作成とその評価

(1) 麹試料

NIR 法により検量線を作成する際に最も重要なことは、試料の集め方が問題となる。なるべく測定対象となる特性（品種、産地、収穫年度、精米歩合等）を有する試料を全て網羅するように集めて検量線を作成しなければ、得られた検量線はその回限りの適用しかできず、広く用いることはできない。当然、測定環境が変化すれば、検量線について再検討しなければならない。

そこで、麹試料は、品種としては日本晴、ニシホマレ、山田錦、五百万石など 7 品種、生産年度は平成 4、5 年度産米の 2 年度分、精米歩合は 90、80、75、70、65、60、50%、また整粒麹のほか碎米及び微碎米の白米を使用した清酒麹の製造ラインからランダムに 150 点を経時的に採取した。このことで、NIR 法による検量線作成時の原料白米の品種、生産年度、精米歩合及び粒度による影響を極力排除した。

なお、清酒麹中の化学分析による菌体量の測定は藤井他¹⁶⁾による細胞壁溶解酵素分解法により行った。

(2) 検量線の作成とその評価

検量線の作成と評価のため、NIR 測定で得られた麹試料 150 点の NIR スペクトルデータを 2 群に分け、一方を検量線作用に、他方を評価用とした。両試料群の麹菌体量値を第 1 表に示した。

検量線は、検量線作成用スペクトルデータを 2 次微分処理したデータをもとに麹菌体量を目的変数、NIR

第 1 表 NIR 法の検量線とその評価に用いた麹の菌体量

	検量線	評価
試料数	73	77
レンジ*	0.16-10.69	0.15-10.65
平均*	5.94	5.82
標準偏差*	3.11	2.64

*：酵素法による菌体量 (mg/g・麹)。

第2表 重回帰分析により作成した検量線

選択した波長 (nm)	R	SEC
2348 1730 2302 1348	0.988	0.496

R：重相関係数

SEC：検量線の標準誤差

スペクトル値を説明変数とした重回帰分析を行い、両者間で相関の高い波長を選択させて検量線を作成した。その結果、2,348, 1,730, 2,302, 1,348 nm の4波長による回帰式を得た。この時の標準誤差 SEC(Standard Error of Calibration) は0.496, 重相関係数 R は0.9879 であった。(第2表)

次に、評価用スペクトルデータを未知試料として、検量線を用いて麴菌体量を測定し、実測値との比較を行った。近赤外スペクトル処理ソフトウェアとして NIR Systems 社製 NSAS-PC (Near Infrared Spectral Analysis Software) を使用した。

第1図に NIR 法で作成した検量線からの計算値と酵素法による分析値との相関図を示したが、計算値と分析値の差の標準偏差 SDD (Standard Deviation of Differences) が0.535, 相関係数 r は0.980 と良好な評価結果が得られた。

4. NIR 法で精度よく測れる理由

なぜ粒のままで麴の菌体量が精度よく測れるのかについて考察すると、まず粗粒サンプルセルの測定面積が格段に広いため、採取し測定する試料量を多くできることが考えられる。

さらに、原田他²⁴⁾は麴を乾燥しテストミルにより搗精して菌体の分布を測定したところ、菌体は麴の表面付近に集中して存在することを確認しており、ITO 他²⁵⁾も菌体量は表面からの距離に指数的に分布していると報告している。確かに、走査型電子顕微鏡で麴を観察すると、写真3, 4に示すように麴の表面は麴菌体により覆われており、しかも、その断面を見ると写

写真3 麴表面の走査型電顕写真-1

第1図 麴菌体量の従来法分析値と NIR 法分析値との相関図

写真 4 麴表面の走査型電顕写真-2

写真 5 麴の断面の走査型電顕写真

真5に示すように菌体が表層に集中していることがわかる。

従って、麴菌体に関する情報はほとんど表面に存在すると考えられ、このことが粉碎せずに粒状のまま

写真 6 大吟醸麴の断面の走査型電顕写真

NIR 測定することで、より精度の高い結果を得ることができると考えられる。

このように、この方法では、麴を前処理することなく粒状のまま測定することができるため、現場における工程管理に十分利用でき、オンライン測定にも応用可能である。

ただし、麴表面での増殖を極端に抑え、破精込み(麴菌の米粒内部への増殖)を深くした大吟醸麴(写真 6)などについては、一般の麴とは菌体量の分布が異なるため²⁵⁾、今後さらに検討する必要がある。

5. 主波長 (2,348 nm) の由来

重回帰式の主波長として 2,348 nm (偏相関係数 = 0.933 と 4 波長のうち最も大きい)が、また、第 2 波長として 1,730 nm が選択されていたが、これらの波長は小島他²³⁾の報告した検量線でも選択されており、麴

第 2 図 麴の外層区分の NIR スペクトル

菌体の NIR スペクトルにも存在するとしている。

(1) 麴表層部の NIR スペクトル

麴菌体は麴の表面付近に存在している^{24,25)}ことから、2,348 nm における吸収が麴菌体由来であるならば、麴を搗精し麴表層の菌体を除去することにより、もしくは麴表面の情報を NIR で得ているわけであるから麴菌体でなくても表面が削られれば情報が少なくなりその吸収は弱くなると考えられた。そこで麴を乾燥した後搗精し、NIR 測定を行いその 2 次微分スペクトルを検討した結果、第 2 図に示すように乾燥麴の表層を削り取るに従って 2,348 nm の吸収ピークは小さくなり、外層の除去率 10% 以上では消失し、逆に除去した外層区分に 2,348 nm の吸収が存在した。

また、以前我々が麴菌体を測定した方法はアルコールによる脱水を行っていたため^{21,22)}、検量線として得られた主波長は、2,150 nm 付近で、N-Acetyl-D-Glucosamine のアミド基由来の波長であると推定していた。しかし、N-Acetyl-D-Glucosamine や Chitin にはこの付近に吸収波長がないため、麴菌が増殖したことにより分解生成されたものを 2 次的に捉えているとも考えられたが、関連する物質のスペクトルに一致するものはなかった。

(2) 液体培養菌体の NIR スペクトル

液体培養菌体を調整し、菌体の NIR 測定を行い、培養菌体の 2 次微分スペクトルを検討した結果、乾燥及び湿菌体とともに、1,724、1,760、2,054、2,170、2,272、2,308、2,348 nm に吸収が認められ、2,348 nm

が小島他²³⁾の報告にあるように菌体に由来する波長であると推定された。また、このスペクトルが、乾燥麴を搗精した外層区分 (0~2%) のスペクトルとほとんど一致することを確認した。今回、小島他²³⁾が主波長に用いた 1,730 nm に相当すると考えられる吸収が 1,724 nm に乾燥菌体で確認できたが、湿菌体では非常に弱い吸収であった。しかし、2,348 nm はいずれの菌体でもはっきりとした吸収を示した (第 3 図)。

(3) 酵素処理による培養菌体細胞壁除去の影響

2,348 nm は、麴菌体由来の吸収であると推察されたが、先に述べたように、麴菌体細胞壁の構成成分である Chitin 及び N-Acetyl-D-Glucosamine の NIR スペクトルには 2,348 nm における吸収は認められず、細胞壁由来ではないと考えられた。

そこで、細胞壁を除去した麴菌体について NIR 測定を行ったところ、第 4 図に示すように細胞壁を取り除くことで、2,348 nm 及び 2,308 nm の 2 波長が際立って吸収強度が強くなり、さらに 1,724 nm 及び 1,760 nm の吸収も強くなった。このことから 2,348 nm は、麴菌体の細胞壁ではなく菌体内部の成分と考えられた。

(4) 培養菌体からの脂質の抽出

そこで、2,348 nm などの吸収波長は油脂に強い吸収及び帰属を持つこと²⁶⁾、各種脂肪酸の吸収波長であること²⁶⁾、KAMISHIKIRYO ら²⁷⁾も脂質の吸収波長としてこれらの波長を確認していることなどから、麴菌体中の脂質に着目し、細胞壁除去後の菌体から Bligh-Dyer 法²⁸⁾により脂質成分を抽出した。その結

第 3 図 培養菌体の NIR スペクトル

第4図 細胞壁溶解酵素で処理した麹菌体の NIR スペクトル

第5図 溶媒処理した麹菌体の NIR スペクトル

果、第5図に示すように2,348 nmの他、2,308、1,760、1,724 nmの菌体特有と考えられた吸収が菌体スペクトルから消失し、逆にクロロホルムやアセトンにより抽出された物質のスペクトル中に菌体から消失した波長の吸収が認められた。

一方、清酒の製造工程と脂質に関して、豊沢他²⁹⁾は粗脂肪は蒸米に比べ酒母麴で約35倍、添麴で約10倍になり、また、石川他³⁰⁾は、製麴中に麹菌体量と並行して脂質が増加し、出麴時には蒸米と比較して粗脂肪

は約8倍(440 mg/麴100 g)になると報告している。この間の結合脂質の減少はわずかであり、粗脂肪の増加は麹菌の生産によるものとしている。ちなみに、液体培養した麹菌の脂肪酸量は2.5～4.3%であり、米麴のそれは102～108 mgである³¹⁾と報告している。

従って、今回の検量線で選択された波長の帰属を厳密に決定するには種々の手段に拠らなければならないが、2,348、1,730、2,302 nmは麹菌体中の脂質関連物質に帰因した吸収スペクトルであることが推定され、

このことが高精度に菌体の測定が可能な理由であると推察した。

しかし、測定している脂質がすべて菌体由来であるかについては今後検討する必要がある。米の胚乳澱粉に含まれる結合脂質はアミロースとラセン状複合体を作っていると考えられる³²⁾。製麴による結合脂質の減少は少ないとしている一方、吉澤他²³⁾は、麴菌の酵素により分解され、担体としてのアミロースを失った米中の結合脂質は抽出されやすい粗脂肪に転化すると報告している。写真5に示すように麴表面付近の胚乳組織は麴菌に破壊されその形状を留めておらず、胚乳中の脂質についても一部考慮しなければならないと考える。

6. オンライン測定を試み

NIR 法により、製麴中の麴菌体量の測定が精度よくできることがわかったので、次にオンライン測定によるモニタリングを検討した。近赤外分光装置の検出部を光ファイバーによるリモート反射型プローブ(写真7)に付け替え、先に作成した NIR の検量線を用いて製麴経過のモニタリングを行った。ただし、この検出器は水分に弱く高温高湿の製麴室に放置できないため、

写真7 リモート反射型プローブ

麴を一端外に出して測定した。第6図にその結果を示すが、50%の麴については全体にいくぶんバイアスがかかっているものの、70%の麴では NIR 法による麴菌体量和酵素法の値とはよく一致していた。NIR の測定環境が変われば検量線の再検討が必要となるが、ここで示したようにこの検量線には汎用性があり、通常の製麴においては十分実用に耐えうるものと考えられた。また、50%麴の初期に NIR 法と酵素法で値に違いがでたのは、①粒度の影響を十分に排除できていない、②50%精白米では麴菌の生育バランスが異なる、などが

第6図 拡散反射型プローブによるモニタリングの結果

第7図 ダイレクトライト反射システムの例

考えられ、今後検討しなければならない。

最近、この検出器の欠点を補正するため、第7図に示すような検出ヘッドにバージガスを送りながらオンラインで測定を行うダイレクトライト反射システムが開発され、実際に自動製麺機の中でのモニタリングを行っている³⁴⁾。

おわりに

NIR法は非破壊分析法の代表選手といわれ、多くの食品分野での応用例が報告されたものの、そのほとんどはNIR法の利用の可能性を示したのみであった。しかし、醸造の分野においても、近年その実用例が多く報告され、日本における初めての公定法として1993年4月から、醤油のJAS格付け検査のスクリーニング法として採用されている。今後、多くの分野でも公定法として取り入れられるであろう。

NIR法の最大の欠点は、その装置がまだまだ高価なことである。しかし、NIR法の普及とともに近赤外分光分析装置の価格も下がってきており、また、その機種も豊富になってきている。検量線の波長とその帰属が明らかになれば、高価な汎用機でなく安価なフィルタータイプの専用機を用いることも可能である。さらに普及が進み汎用の分析機器と近い価格になれば、一般の製造場においても分析手段の一つとして使われる

こともそう遠くはないと考えられる。

なお、NIR法について関心のある方は、関連の成書^{35~38)}が出ているのでこれらを参考にされたい。また、少し専門的になるが、NIR法を中心とした「非破壊計測シンポジウム」(日本食品科学工学会主催)が毎年秋に開催されているので参加していただきたい。

<国税庁醸造研究所>

参考文献

- 1) 松永貞一, 長谷川美奈子, 龍野国弘, 川満幸子, 大崎一男, 三浦 剛, 尾崎幸洋, 黒坂君生: 感染症学雑誌, **69**, 729 (1995)
- 2) H. KAMISHIKIRYO, K. HASEGAWA and T. MATOBA: *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, **38**, 850 (1991)
- 3) 宮澤光博, 園山正史: 分光研究, **44**, 254 (1995)
- 4) 三浦 剛: 計装, **35**, (6) 21 (1992)
- 5) 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)
- 6) 若井芳則: 醸協, **87**, (7) 492 (1992)
- 7) 橋本彦堯, 飯塚佳子, 小林邦男: 醸協, **87**, (10) 711 (1992)
- 8) K. ARIMA and T. UOZUMI: *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 119 (1967)
- 9) 大内弘造, 石戸輝雄, 菅間誠之助, 野白喜久雄:

- 醸協, **62**, 1029 (1967)
- 10) 小崎道雄, 北原覚雄: 日食工誌, **21**, 38 (1974)
 - 11) 中台忠信: 醬研, **3**, 68 (1977)
 - 12) Y. SAKURAI, T. H. LEE and H. SHIOTA: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 619 (1977)
 - 13) 古川恵司, 家村芳次, 古川彰久, 川崎 恒: 醸協, **86**, 801 (1991)
 - 14) 加藤 威, 小林邦男, 泉 保廣, 花岡嘉夫: 農化, **50**, 395 (1976)
 - 15) 五味勝也, 岡崎直人, 田中利雄, 熊谷知栄子, 井上 博, 飯村 稯, 原 昌道: 醸協, **82**, 130 (1987)
 - 16) 藤井史子, 尾関健二, 神田晃敬, 浜地正昭, 布川弥太郎: 醸協, **87**, 757 (1992)
 - 17) S. SUGAMA and N. OKAZAKI: *J. Ferment. Technol.*, **57**, 408 (1979)
 - 18) N. OKAZAKI and S. SUGAMA: *J. Ferment. Technol.*, **57**, 413 (1979)
 - 19) N. OKAZAKI, S. SUGAMA and T. TANAKA: *J. Ferment. Technol.*, **58**, 471 (1980)
 - 20) H. NARAHARA, Y. KOYAMA, T. YOSHIDA, S. PICHANGKURA, R. UEDA and H. TGUCHI: *J. Ferment. Technol.*, **60**, 411 (1982)
 - 21) 岡崎直人, 福田賢一, 木崎康造, 小林信也: 日本農芸化学会大会要旨集, p.123 (1990)
 - 22) 岡崎直人: 第6回非破壊計測シンポジウム講演要旨集, p.90 (1990)
 - 23) 小島泰弘, 浅井有香理, 秦 洋二, 市川栄治, 川戸章嗣, 今安 聡: 農化, **68**, 801 (1994)
 - 24) 原田祥司, 瀬頭一平, 吉田 肇, 若林邦宏, 伊藤 清, 蓮尾徹夫, 宮野信之: 醸協, **83**, 485 (1988)
 - 25) K. ITO, A. KIMIZUKA, N. OKAZAKI and S. KOBAYASHI: *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 7 (1989)
 - 26) B. G. Osborne and T. Fearn: in "Near Infra-red Spectroscopy in Food Analysis," Longman Scientific and Technical, Harlow, pp.246 (1986)
 - 27) H. KAMISHIKIRYO, K. HASEGAWA, H. TAKAMURA and T. MATOBA: *J. Food Sci.*, **57**, 1239 (1992)
 - 28) 大野公吉, 下条 貞: 新実験化学講座, 20 卷, 立花太郎ら編 (丸善, 東京), p.331 (1978)
 - 29) 豊沢 誠, 米崎治男: 醸工, **31**, 453 (1953)
 - 30) 石川雄章, 吉沢 淑: 醸工, **56**, 24 (1978)
 - 31) 吉沢 淑, 石川雄章: 醸協, **71**, 223 (1976)
 - 32) 檜作 進: 醸協, **89**, 94 (1994)
 - 33) 石川雄章, 吉沢 淑: 農化, **48**, 657 (1974)
 - 34) (株)ニレコ資料
 - 35) 尾崎幸洋, 岩瀬秀夫: 生体分子分光入門, 共立出版, 東京, (1992)
 - 36) 岩元睦夫, 河野澄夫, 魚住 純: 近赤外分光法入門, 幸書房, 東京, (1994)
 - 37) 尾崎幸洋, 河田 聰編著: 近赤外分光法, 学会出版センター, 東京, (1996)
 - 38) 相島鐵郎: ケモメトリックス, 丸善, 東京, (1994)