近赤外分光分析法を用いた清酒麴中の麴菌体量の測定

小島泰弘, 浅井有香理, 秦 洋二, 市川英治

川戸章嗣, 今安 聡

(月桂冠株式会社総合研究所)

平成 5 年 8 月 9 日 受 理

Estimation of Mycelial Weight in Rice *Koji* by Near
Infrared Reflectance SpectroscopyYasuhiro KOJIMA, Yukari ASAI, Yoji HATA, Eiji ICHIKAWA, Akitsugu KAWATO, and
Satoshi IMAYASUResearch Institute, Gekkeikan Sake Co., Ltd., Shimotobakoyanagi-cho 24, Fushimi-ku,
Kyoto 612

The possibility of the use of near infrared (NIR) diffuse reflectance spectroscopy for the estimation of mycelial weight in rice *koji* was investigated. NIR reflectance spectra were collected from rice *koji* samples dried at 100°C for 60 min and ground for 3 min. By multiple linear regression analysis, the results were correlated with the mycelial weight measured by enzymatic hydrolysis, used as the reference method, and a calibration equation was developed. The standard error of prediction was calculated to be 0.31 (mg/g) in the validation of the calibration equation, and the standard deviation of measurements by the reference method was 0.2 (mg/g). These results suggested that the NIR method could be used for the estimation of mycelial weight in rice *koji*. Modification of the method used to dry *koji* samples shortened measurement time. By the NIR method, the mycelial weight of rice *koji* can be measured in 30 min without chemical or biochemical disruption of the rice *koji*.
(Received August 9, 1993)

緒 言

清酒醸造のなかで、麴の製造(製麴)は最終的に製成酒の品質に大きな影響を及ぼす重要な工程である。そして製造する麴の品質を向上させるためには麴菌の増殖を上確に把握し、適正な培養管理を行うことが必要である。しかしながら麴は蒸米を培地とした固体培養物であるため、菌体増殖を直接測定することは難しく、その製麴管理は主に香味や肉眼等による主観的判断に頼っているのが現状である。そこで筆者らは、このような主観的判断にかわる客観的指標による製麴管理を行うため、麴菌体量の迅速で簡便な測定法の開発を検討した。

清酒麴中の菌体量の測定法としては菌体細胞壁の構成成分であるキチンから酸分解によって生ずるグルコサミンを定量する方法が報告されているが⁽¹⁻⁶⁾、定量操作が煩雑であり測定に 10 時間以上を要する。酸分解にかわ

る方法として麴菌細胞壁溶解酵素を用いて細胞壁を加水分解し、生成した *N*-アセチルグルコサミン(以下 GlcNAc)量を定量する方法^(7,8)、およびその改良法⁽⁹⁾も報告され測定時間は短縮されたが、7.5~3.0 時間を必要とする。また製麴に伴う麴菌の呼吸量をモニターし、菌体量をオンラインにて測定する方法⁽¹⁰⁻¹³⁾も報告されているが、培養設備を気密にするなど測定装置に制限が必要である。

一方、非破壊分析法の 1 つである近赤外(NIR)分光分析法は、試料の前処理が簡単で迅速分析が可能であり、すでに小麦やダイズのタンパク質含量測定⁽¹⁴⁾をはじめ、米の食味⁽¹⁵⁾等、さまざまな食品の分析に応用されている。また清酒製造工程においても原料米の分析⁽¹⁶⁻¹⁹⁾および清酒中のアルコールや日本酒度の分析⁽¹⁶⁾が報告されている。筆者らは、この NIR 分析法により、麴菌体量の短時間測定を可能にしたので報告する。

実験方法

1. 原料米 オオセト, 五百万石, 日本晴, ニシホマレ, ヤエコガネ, レイホウ, 美山錦 (精米歩合各 70%) を用いた。

2. 製麴 オオセト: 原料米 1 kg の蒸米に対し市販モヤシ 2.0 g を接種し, 恒温培養器 (ヤマト科学製 Incubator Model IS-81) にて 37°C, 54 時間培養した。培養 24 時間目より経時的にサンプリングを行い, 麴試料 46 点を得た。五百万石, 日本晴, ニシホマレ, ヤエコガネ, レイホウ: オオセトと同様におのおのモヤシを等量接種し, 当社麴室で蓋麴法にて 52 時間培養し 24 時間目より経時的にサンプリングを行い, 麴試料各 11 点 (ニシホマレは 8 点) を得た。さらにこれとは別に五百万石, 日本晴に関しては原料米 1 kg の蒸米に対し市販モヤシ 1.6 g を接種し同様の蓋麴法にて培養を行い, 麴試料各 18 点を得た。美山錦: 原料米 1 kg の蒸米に対し市販モヤシ 0.8 g を接種し, 恒温恒湿器 (ナガノ科学機械製作所製 LH-20-04) にて適宜湿度を調節し 50 時間培養した。24 時間目より経時的にサンプリングを行い, 麴試料 18 点を得た。

3. 従来分析法による麴菌体量測定 五味ら⁽⁸⁾の酵素分解法に準じ, 糸状菌細胞壁溶解酵素, Novozym 234 (NovoNordisk 製) を用いて, 生成する GlcNAc 量を測定した。乾燥麴菌体 1 mg 中の GlcNAc 含量を五味らの報告に従い 139 μg として, 測定値から麴中の麴菌体量を換算し菌体量の対照分析値とした。

4. NIR 測定試料の調製 麴試料 15 g をドライオーブン (ヤマト科学製 Drying Oven DX 41) にて 100°C, 60 分乾燥した後, 高速振動粉碎機 (平工製作所製 Vibrating Sample Mill TI-100) で 3 分間粉碎した。

5. NIR 測定 以下に示す 3 種の形態の麴試料の NIR 測定を行った。

(1) 無処理試料: サンプリングした麴 6.0 g を標準クローズドカップ (ブラン・ルーベ製) に充填した。

(2) 乾燥粒状試料: (1) の麴試料を乾燥処理した乾燥粒状試料 6.5 g を上記カップに充填した。

(3) 乾燥粉碎試料: (2) の試料を粉碎処理した乾燥粉碎試料を上記カップに擦切り量充填した。測定にはブラン・ルーベ製 InfraAlyzer 500 型を用い, 上記各試料を波長 1100~2500 nm の範囲で 2 nm ごとに拡散反射法による NIR スペクトルを測定した。測定は一試料

について 3 回行い, その平均スペクトルを求めた。

6. 重回帰分析 重回帰分析にはブラン・ルーベ製の IDAS (InfraAlyzer Data Analysis Software) プログラムを用いた。NIR 測定で得られたスペクトルファイルをキャリブレーション式作成用とキャリブレーション式評価用に二分割し, 作成用試料に対し対照分析値と各 NIR 原スペクトル値間で重回帰分析を行い, 両者に相関の高い波長をコンビネーション・サーチ法により選択させ, キャリブレーション式を作成した。次に評価用試料を未知試料として麴菌体量測定を行い, 上記キャリブレーション式の評価を行った。

7. 液体培養麴菌体の NIR スペクトル測定 当社保存菌株, *Aspergillus oryzae* OSI-1013 を改変 Czapek-Dox 培地 (3% α 米, 0.3% NaNO_3 , 0.2% KCl , 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.002% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) にて 37°C で 3 日間振盪培養した。G3 ガラスフィルターにて菌体を集菌し, 十分に水洗した後, 麴試料と同様に 100°C, 60 分乾燥し, 粉碎した。この乾燥菌体試料をブラン・ルーベ製微量粉体測定用カップに充填し, NIR スペクトル測定を行った。

実験結果および考察

1. 各種形態試料からのキャリブレーション式の作成 オオセトを原料米とした麴試料 46 点のうち, 30 点をキャリブレーション式作成用とし, 16 点を評価用とした。両試料群の乾燥前の麴菌体量特性値を Table I に示した。この両試料群から, 無処理, 乾燥粒状, 乾燥粉碎の各形態試料それぞれについて重回帰分析を行った (Table II)。出麴付近の試料 3 点を, 対照分析値に用いた酵素分解法でそれぞれ 8 回ずつ測定したところ, 測定誤差の標準偏差は 0.17~0.23 (mg/g) であった。一方, 各形態試料で作成されたキャリブレーション式による,

Table I. Characteristics of Calibration and Prediction Sample Sets of Rice *Koji*

	Calibration set	Prediction set
<i>n</i>	30	16
Range*	0.62~6.57	0.63~6.36
Average*	3.05	3.73
Standard deviation*	1.94	1.80

* (mg/g)

Thirty of the 46 samples of rice *koji* from *Oseto* were selected randomly for calibration and the remaining 16 samples were used for prediction.

Table II. Results of MLR Analysis of NIR Reflectance Spectra Data on Raw, Dry Grain, and Dry Powder Rice *Koji* Samples

	Wavelength selected (nm)					SEC*	R	SEP*	Bias*	MCSEP*
Raw <i>koji</i> (Equation-1)	1534	1730	1744	2374	2458	0.20	0.996	0.40	0.02	0.41
Dry grain (Equation-2)	1212	1730	1744	2038	2220	0.25	0.996	0.25	0.02	0.26
Dry powder (Equation-3)	1380	1730	1744	2220	2248	0.42	0.987	0.31	0.12	0.29

* (mg/g)

SEC, R, SEP, and MCSEP are standard error of calibration, multiple correlation coefficient, standard error of prediction, and mean corrected standard error of prediction, respectively.

Table III. Repeatability in NIR Analysis at Different Sample Preparation

Sample	Mycelial weight ^a	Dry grain with Equation-2		Dry powder with Equation-3	
		Ave. ^b	SD ^c	Ave. ^b	SD ^c
A	1.59	1.36	0.49	1.73	0.12
B	4.39	4.47	0.13	4.51	0.02
C	7.34	7.06	0.43	7.37	0.15

^a Mycelial weight measured by the enzymatic analysis (mg/g).

^b Average at three times measurement (mg/g).

^c Standard deviation at three times measurement (mg/g).

The equations from dry grain (Equation-2) and dry powder (Equation-3) samples are described in Table II. Three samples of *koji* at various culture periods were dried at 100°C for 60 min. The dried sample was directly subjected to NIR analysis with the Equation-2 for dry grain sample, while it was ground before NIR analysis with the Equation-3 for dry powder sample. Each sample was measured three times with NIR spectrophotometer, and the predicted values from the three data were averaged.

NIR 測定値と対照分析値の間の誤差の標準偏差 SEP (Table II) はこの従来法の標準偏差と大差がないことから、本 NIR 法は従来法に匹敵する精度で麴菌体量を迅速に測定できると考えられた。

乾燥粒状試料、乾燥粉碎試料のそれぞれを各 3 回繰り返し測定し、試料形状の違いが測定再現性精度に与える影響を調べた。Table III に示したように粉碎試料のほうが菌体が試料中に均一に分布するため、同一試料を繰り返し測定した際の標準偏差が小さく測定の再現性精度は高くなった。一方、粒状試料の場合は麴菌体は麴の表面付近に存在するため NIR 測定によって菌体由来する吸収を検出できやすいと考えられるが、試料粒径が

Table IV. Prediction Results for Mycelial Weight of Dry Powder Rice *Koji* Prepared from Various Species of Rice with the Equation-3

Species of rice	SEP	Bias	MCSEP
<i>Gohyakumangoku</i> (n=18)	0.83	0.28	0.80
<i>Nihonbare</i> (n=18)	0.36	-0.21	0.31
<i>Nishihomare</i> (n=8)	0.63	0.30	0.60

(mg/g)

NIR data of dry powder *koji* prepared from each 3 species of rice were used for prediction with the Equation-3 in Table II. SEP and MCSEP are described in Table II.

5mm 前後と大きいため、拡散反射光の不均一性により測定の再現性精度が低下した。また粒状試料の場合はこの粒径の変化や破精込み等による試料表面の状態の変化の影響も受けやすく、正確な菌体量予測のためにはさらに検討が必要であると考えられる。

以上のように、粉碎処理では均質な試料が得られ、測定再現性精度が高いことから、3つの試料形態のなかでは乾燥粉碎試料による菌体量測定が最も信頼性が高いと考えられた。

2. 原料米品種の NIR 測定への影響

乾燥粉碎処理を試料調製法として、原料米品種の NIR 測定への影響を検討した。五百万石 18 点、日本晴 18 点、ニシホマレ 8 点の麴の乾燥粉碎試料の麴菌体量を、オオセトから作成した Equation-3 で予測した。その結果、日本晴を用いた麴の菌体量は精度よく測定可能であったが、五百万石、ニシホマレの精度は低く、原料米品種により測定精度に差が認められた (Table IV)。この原因として、上記キャリブレーション式においては原料米品種の影響を受ける波長が選択されていることが考えられた。そこでいずれの品種にも偏らない普遍的な波長を選択するため、オオセト、五百万石、日本晴、ヤエコ

Table V. Results of MLR Analysis of the Mixed NIR Data from Koji Samples of Five Species of Rice

	Wavelength selected (nm)				SEC*	R	SEP*	Bias*	MCSEP*
Dry powder (Equation-4)	1730	1738	2348	2360	0.56	0.980	0.43	0.12	0.42
							(Gohyakumangoku)		
							0.34	0.16	0.31
							(Nihonbare)		
							0.35	0.12	0.35
							(Nishihomare)		

* (mg/g)

NIR data used for prediction were described in Table IV.

Fig. 1. Correlation of Mycelial Weight of Rice Koji Prepared from Various Species of Rice with the Value Predicted by the NIR Analysis with Equation-4. Symbols: ●, Gohyakumangoku; △, Nihonbare; ▲, Nishihomare.

ガネ, レイハウの5品種, 各11点ずつ合計55点からキャリブレーション式 Equation-4 を作成し, 先の評価用試料を未知試料として評価を行った. キャリブレーション結果を Table V および Fig. 1 に示した. その結果, 得られた Equation-4 はオオセトのみから作成した Equation-3 に比べてキャリブレーション時の NIR 測定値と対照分析値の標準偏差 SEC や重相関係数 R は若干低下した. しかし評価用試料の菌体量測定を行ったところ前述のオオセトのみからの Equation-3 よりも各品種とも誤差の小さいキャリブレーション式であることが明らかとなった. このことから, 5品種の原料米を用いた麴試料から作成したキャリブレーション式では, 原料米品種の影響を受けにくい波長が選択され, 正確な菌体量

測定が行われているものと考えられた.

3. 麴菌体の NIR スペクトル

以上麴菌体量測定用に行ったいずれのキャリブレーションにおいても, その選択波長には 1730 nm が含まれており, 本波長が麴菌体量の測定に重要であることが示唆された. そこで, このキャリブレーション式での選択波長の帰属を検討するため, 麴菌体と蒸米の NIR スペクトルの比較を行った. 麴は蒸米を培地とした固体培養物であるため, 麴から麴菌体のみを分離することは困難である. そこで α 米を含む液体培地にて培養して得られる麴菌体を用いて, その NIR スペクトルを測定し, 2次微分処理により麴菌体に特徴的な吸収バンドを調べた (Fig. 2). 対照として, 蒸米の乾燥粉碎試料の2次微分スペクトルを示した. 一般に2次微分スペクトルの吸収バンドは原スペクトルに対して位相が反転し, そのピークは下向きに現れる. 両者を比較したところ, 蒸米試料には認められず, 麴菌体に特徴的な吸収として 1730, 2056, 2168, 2308, 2348 nm のバンドが確認された. 本スペクトルの試料は液体培養から得られた菌体であり, 蒸米上に生育した菌体とは異なるものの, 一連の重回帰分析から選択された波長 1730 nm が, 液体培養の麴菌体に特徴的な吸収バンドであったことから, 麴中の菌体量測定には本波長が非常に重要であると推測された. またキャリブレーション式 Equation-4 では 2348 nm も選択されたことでさらに精度が向上したものと考えられた.

4. 乾燥方法の検討

測定時間の短縮を図るため, 従来のドライオープンによる 100°C, 60 分乾燥と同等の乾燥状態が得られる短時間の乾燥方法の検討を行った. 電子レンジ (シャープ製 R-528 消費電力 960 W) での乾燥を行ったところ, 5 分で従来乾燥法と同等の水分含量となった. しかし一部で

Fig. 2. Near Infrared Diffuse Reflectance Spectra after Second Derivative Mathematical Transformation of *Koji* Mold and Steamed Rice. *Koji* mold in submerged culture and steamed rice were dried at 100°C for 60 min and ground, and NIR spectra of these powder were collected. The raw spectra were subjected to second derivative mathematical transformation by IDAS program (Bran+Luebbe Co., Ltd.) with following transform parameters: 4 nm between output points, 8 nm in moving average, 8 nm per derivative segment, and 16 nm between derivative segments. A solid line and a dotted line indicate spectra of *koji* mold and steamed rice, respectively. Wavelengths selected in MLR analysis are marked by **a** with an arrow at 1730 nm and **b** with an arrow at 2348 nm.

焦げが生じるなど乾燥状態が不均質となった。次に通風乾燥機（ヤマト科学製 Constant Temperature Oven Model DN-91）での乾燥を行ったところ、100°C、15分で均質な乾燥麴が得られた。120°C、150°Cでの検討も行ったが、電子レンジと同様に一部で焦げが生じるなど乾燥状態が不均質となった。そこで五百万石を原料米とした麴を用いて従来乾燥と100°C、15分の通風乾燥において、乾燥方法の違いによる麴試料の乾燥状態（Table VI）および NIR 測定値に与える影響（Table VII）を検討した。NIR 測定にはキャリブレーション式 Equation-4 を用いた。その結果、通風乾燥のほうが乾燥後の水分含量がやや高かったものの、NIR 測定値では両乾燥法で有意な差は認められず、通風 100°C、15 分乾燥法が従来乾燥法の代替法になりうることが示された。

Table VI. Influence of Drying Method on Water Content in *Koji* Samples

Sample	Before drying ^a	After drying					
		Without blow			Under blow		
		Ave. ^b	SD ^c	C. V. ^d	Ave. ^b	SD ^c	C. V. ^d
A	33.8	4.0	0.4	10.0	10.2	0.8	7.7
B	31.6	3.6	0.3	8.3	7.5	0.9	12.0
C	28.0	4.5	0.1	2.2	7.5	0.3	4.0

^a Water content of raw *koji* (w/w%).

^b Average of water contents in five samples after drying (w/w%).

^c Standard deviation of water contents in five samples after drying (w/w%).

^d Coefficient of variation of water contents in five samples after drying (%).

Five samples of each rice *koji* at various culture periods were dried at 100°C for 60 min without blow or for 15 min under blow. Water content of *koji* sample was measured by drying at 135°C for 3 h⁽²⁰⁾.

Table VII. Effect of Drying Method on NIR Analysis

Sample	Mycelial weight ^a	NIR value					
		Without blow			Under blow		
		Ave. ^b	SD ^c	C. V. ^d	Ave. ^b	SD ^c	C. V. ^d
A	2.68	3.01	0.14	4.5	2.55	0.15	5.9
B	4.50	4.62	0.46	10.0	4.42	0.12	2.7
C	5.45	5.74	0.41	7.1	5.86	0.17	2.9

^a Mycelial weight measured by the enzymatic analysis (mg/g).

^b Average in five samples (mg/g).

^c Standard deviation in five samples (mg/g).

^d Coefficient of variation in five samples (%).

The samples described in Table VI were subjected to NIR analysis with Equation-4.

5. NIR 法を用いた麴菌体増殖のモニタリング

キャリブレーション式 Equation-4 を用いて、製麴工程における麴菌の増殖のモニタリングを試みた。乾燥方法として上記で検討した通風 100°C、15 分乾燥法を用いることにより、乾燥、粉碎を含めた測定時間は約 30 分であった。美山錦を原料米とした製麴において培養開始 24 時間目から 1.5 時間ごとに麴を採取し、直ちに NIR 分析を行って麴菌体増殖を追跡した。なお、従来分析法（酵素分解法）による測定値との相関係数は 0.971 であった。NIR 測定による麴菌体量の経時変化を Fig. 3 に示した。また、増殖パターンの把握を行うため、麴菌体

Fig. 3. Monitoring of Mycelial Growth in Rice *Koji* Cultivation by the NIR Analysis. Mycelial weight of *koji* samples were predicted by the NIR analysis with Equation-4. A solid line indicates a growth curve calculated with the following logistic equations described by Okazaki *et al.*⁽¹²⁾; $m = \frac{N}{1 + ke^{-\mu t}}$, $k = \frac{N}{m_0} - 1$ where; m , mycelial weight (mg/g); t , culture period (h); μ , specific growth rate (h^{-1}); m_0 , initial mycelial weight (mg/g); N , maximum value of m (mg/g). From the data predicted by the NIR analysis, μ , m_0 , and N were calculated to be 1.75, 3.82×10^{-2} , and 8.63, respectively.

増殖に logistic な増殖モデル⁽¹²⁾を仮定し、本法によって得られた測定データから予測される増殖曲線を求め、Fig. 3 に付記した。このように NIR 法により製麹期間中の麹菌体量を迅速に測定し、その測定値から菌体の増殖曲線を算出できることが示された。

以上示してきたように麹菌体増殖は NIR 法を用いて十分に追跡が可能であることが明らかとなった。測定時間は、酵素分解法での 7.5 時間に対して NIR 法では上述のように 30 分であり、測定操作も簡便な NIR 法は菌体増殖の追跡に適した測定法であると考えられる。したがって本法により製麹工程における菌体増殖のリアルタイムに近い測定が可能となり、その測定結果は製麹での培養管理操作の時期や培養終了時などの判定に貴重な情報となるものと期待される。

要 約

(1) 近赤外分光分析法により清酒麹中の麹菌体量を、酵素分解による従来の測定法と同等の精度で測定できることが明らかとなった。本法は麹を乾燥粉碎処理のみで測定できるため、測定操作が簡便かつ迅速になった。

(2) 複数種の原料米を用いて製麹を行い、これらを含めた試料によって重回帰分析を行ったところ、原料米品種に影響を受けないキャリブレーション式が得られた。

(3) 本法での測定時間は約 30 分であるため、製麹工程における麹菌体の増殖のモニタリングが可能になった。

- (1) K. Arima and T. Uozumi: *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 119—123 (1967).
- (2) 大内弘造, 石戸輝雄, 菅間誠之助, 野白喜久雄: 醸協, **62**, 1029—1033 (1967).
- (3) 小崎道雄, 北原覚雄: 日食工誌, **21**, 38—41 (1974).
- (4) 中台忠信: 醬研, **3**, 68—74 (1977).
- (5) Y. Sakurai, T. H. Lee, and H. Shiota: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 619—624 (1977).
- (6) 古川恵司, 家村芳次, 古川彰久, 川崎 恒: 醸協, **86**, 801—803 (1991).
- (7) 加藤 威, 小林邦男, 泉 保廣, 花岡嘉夫: 農化, **50**, 395—402 (1976).
- (8) 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**, 130—133 (1987).
- (9) 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—759 (1992).
- (10) S. Sugama and N. Okazaki: *J. Ferment. Technol.*, **57**, 408—412 (1979).
- (11) N. Okazaki and S. Sugama: *J. Ferment. Technol.*, **57**, 413—417 (1979).
- (12) N. Okazaki, S. Sugama, and T. Tanaka: *J. Ferment. Technol.*, **58**, 471—476 (1980).
- (13) H. Narahara, Y. Koyama, T. Yoshida, S. Pichangkura, R. Ueda, and H. Taguchi: *J. Ferment. Technol.*, **60**, 311—319 (1982).
- (14) B. G. Osborne and T. Fearn: in "Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis," Longman Scientific and Technical, Harlow, 1986, pp. 120—130.
- (15) 河野澄夫, 岩元睦夫: 食品加工技術, **12**, 129—136 (1992).
- (16) 若井芳則, 井上佳彦, 西川泰央, 邑田淳一, 三浦 剛: 醸協, **79**, 445—446 (1984).
- (17) 高橋 仁: 秋田県醸造試験場報告, **23**, 9—11

- (1991).
- (18) 岡崎直人, 福田賢一, 木崎康造, 小林信也: 醸協, 86, 299—303 (1991).
- (19) 若井芳則: 醸協, 87, 492—496 (1992).
- (20) 注解編集委員会編: 「第3回改正 国税庁所定分析法注解」, 日本醸造協会, 東京, 1974, p. 188.
-