

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580356

研究課題名(和文) 蛍光分光法を用いた麹菌活性評価システムの開発

研究課題名(英文) Evaluation system development for sake koji activity by fluorescence analysis

研究代表者

齋藤 高弘 (SAITO, Takahiro)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：50221990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光分光法による麹菌活性評価技術の開発を目的に、麹菌を測定するのに適した励起波長と検出波長を選定し、麹菌体量、酵素活性との関係を検討した。その結果、麹菌を測定するには励起波長410nm、検出波長630nmが最適と判断された。殺菌した米麹からは蛍光を確認できなかったため、この蛍光は菌の活性に由来するものと考えられた。また、本手法は、米麹の培養と共に変化する含水率やグルコース濃度の影響を受けない事が明らかになった。蛍光強度は、麹菌体量や酵素活性と高い相関が得られた。この事により、蛍光分光法は麹菌体量や α -アミラーゼ活性、酸性カルボキシペプチダーゼ活性を評価するのに利用適性が高いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Appropriate excitation and detection wavelengths were chosen for measuring various parameters describing the activity of *Aspergillus oryzae*. As a result, we found that the best excitation and detection wavelengths for investigating *Aspergillus oryzae* were 410 and 630 nm, respectively. The fluorescence may be induced by the activity of *Aspergillus oryzae* because no fluorescence peaks were detected from sterilized rice koji. In addition, we showed that this system was not influenced by the moisture content or glucose concentration, which both changed during the rice koji cultivation. The fluorescence emission strength was closely correlated with both the mycelial weight in rice koji and enzyme activity. Thus, fluorescence spectroscopy should prove suitable for evaluating the mycelia weight in rice koji, amylase activity, and acid carboxypeptidase activity.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業工学・農業情報工学

キーワード：麹菌 蛍光 活性

1. 研究開始当初の背景

麹 (*Aspergillus oryzae*) 造りは、清酒、味噌、食酢、醤油、焼酎、泡盛など、発酵・醸造食品を生産する際に用いる、東アジア圏特有の微生物と人間の技術が融合した食品製造技術である。日本における伝統的な食の多様性は麹の力に依存する部分が大きく、昨今この発酵技術が世界各国から注目を浴びている。しかし、これらの食品は地域に根ざした伝統的な手作業や高齢化した従事者に依存している場合が多く、麹造り技術(繁殖・管理技術)の次世代への伝承は難しい実情がある。

今回対象としてとりあげる、清酒造りに着目すると、多くの蔵元は、杜氏の高齢化(栃木県では酒蔵の4割が70歳以上)の問題を抱え、技術の伝承は急務の課題である。麹造りは一に麹、二に醗(もと)、三に造りといわれる清酒品質を左右する最も重要な工程で、1~2時間間隔で延べ50時間におよぶ管理を要する重労働な作業である。しかし、精密さを要するこれら麹菌の微生物活性の評価は経験則と官能に依存し過ぎる背景があり、技術の伝承には麹菌の状態を迅速かつ簡便に数値化する手法の開発が強く求められている。

これらの課題に対し、既往の研究の多くは効率的な生産法、吟醸香酵母の開発などの大量生産に結びつく技術開発からのアプローチがほとんどであった

この背景のもと、迅速かつ簡便に多種多様な物質の状態を評価するマーカーとして申請者は微弱な光検出に着目してきた。これは、反応系の分子が励起状態から失活する際に肉眼の検出限界以下の微弱な光を放つ現象で、様々な物質の内在反応と結びつく(大澤, 2006)。発光法は、自発発光、化学発光、光励起発光(蛍光)などの分子を励起させる種類の違いにより分別される。これまでに、本発光法を用い再現性の高い計測・評価指標の確立(齋藤, 2006)、清酒原料の米の品質評価への応用(齋藤, 2007)、清酒の過酸化・抗酸化評価に適する発光系の選択(齋藤, 2009)を明らかにした。今回の麹菌計測には非浸襲で前処理が不要であり、かつ検出可能な情報量の多い蛍光分光法の優位性が高いとする裏付けデータを取得し、申請に至った。

2. 研究の目的

蛍光分光法は、非浸襲で薬品添加などの前処理が必要なく、迅速性を有する方法で麹菌活性の連続モニタリングへの適性が高い。そこで、本研究は、蛍光分光法を用いて清酒製造工程の麹の繁殖過程のモニタリングを通して、麹菌活性を数値化し、熟練者の官能評価と結び付け、迅速かつ簡便な官能を補完する麹菌活性評価システムを開発するものである。その際重要となる要素は、再現性の高い麹菌光検出手法の確立と、その発光スペク

トルの解析と発光因子の特定による本手法の科学的裏づけを明確にすることである。

3. 研究の方法

蛍光分光法には蛍光プレートリーダー infinite M200, F200(TECAN 社製)を使用した。麹菌の蛍光スペクトルや、主要成分などの影響を確認するには infinite M200 を、繁殖に伴う蛍光強度の変化を測定するには infinite F200 を用いた。麹は標準製麹試験法(12)に準じてシャーレまたは96穴マイクロプレート上で培養し、米を用いて培養した米麹と、ポテトデキストロース寒天培地(日水製薬社製)を用いて培養した培地麹の2種類用意した。

蛍光分光法と比較した指標は、麹菌体量、 α -アミラーゼ活性、グルコアミラーゼ活性、 β -グルコシダーゼ活性、酸性カルボキシペプチダーゼ活性、ATPの6項目とした。麹菌体量の測定は、五味他(3)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。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、酸性カルボキシペプチダーゼ測定キット(KIKKOMAN)を、ATPの測定にはルシフェール 250 プラス、ルシフェール消去試薬(KIKKOMAN)を使用し、各測定キットに付属している説明書に従い測定を行った。蛍光分光法とATPは、目標培養時間に達した試料を随時測定に供し、麹菌体量と酵素活性はサンプリングした試料をすぐに凍結保存し一括して測定した。

4. 研究成果

(1) 励起波長と検出波長の選定 米麹の測定に適した励起波長と検出波長を決定するため、培養48時間の米麹と蒸米を365~450nmの波長の光で励起し、得られた蛍光スペクトルを比較した。その結果、励起波長400、425nmにおいて、麹菌由来と思われる蛍光が確認された。励起波長425nmにおける米麹と蒸米の蛍光スペクトルをFig.1に示す。蛍光強度は検出波長470~480nmで最大を示し、波長が長くなるにつれ値は減少する傾向を示した。

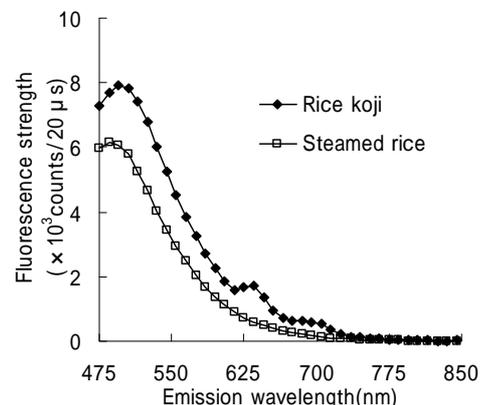


Fig.1 励起波長425nmにおける蛍光スペクトル

しかし、米麹においては検出波長 630、690nm にて再度値が増加するという特異的な傾向が確認された。そのため、蒸米と比べ明確に蛍光強度の増加が見られた検出波長 630nm の値を測定する事で、麹菌からの情報を得られると考え、検出波長 630nm の蛍光強度を測定するのに最も適した励起波長を検討した。その結果、励起波長 410nm において検出波長 630nm の蛍光強度は最大となった。この事から検出波長 630nm の蛍光強度を測定するには励起波長 410nm が最適と判断した。そこで実際に励起波長を 410nm に設定し、培養 0~48 時間の米麹と、培地に 0~18 時間培養した麹を測定した。米麹の蛍光スペクトルの変化を計測した結果、培養 0、12 時間の米麹は肉眼では菌糸が確認できず、蛍光強度にも大きな変化は見られなかったが、培養 30、48 時間の米麹は菌糸の増殖が確認でき検出波長 630nm において蛍光強度の増加が見られた。また、培地で培養した麹からも同様の傾向が確認された。米麹、培地で培養した麹共に検出波長 480nm において蛍光強度は最大となったが、培養が進むにつれ米麹は増加し、培地麹は減少したため、検出波長 480nm 付近における蛍光は麹菌とは直接関係していないと考えられた。そこで、励起波長を 410nm、検出波長を 630nm に選定し、この条件における製麹中の蛍光強度の経時変化を Fig.2 に示す。米麹の蛍光強度は、培養 20~38 時間の間で急激に増加し、その後培養 58 時間まで一定に推移した後、培養 74 時間では減少傾向を示した。また、同時に測定した蒸米の蛍光強度は徐々に増加する傾向を示し、米麹とは大きく異なった。

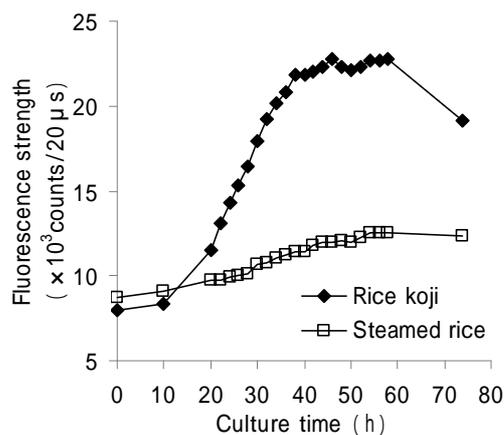


Fig.2 米麹と蒸米の蛍光強度の経時変化
(2) 主要成分や他因子が蛍光へ与える影響
米麹の含水率は菌の繁殖と共に 17~33%の範囲で減少する 1) ため、含水率を 13.8、24.2、33.2%に調整した蒸米を用い、含水率が蛍光強度に与える影響を検討した。その結果、検出波長 630nm の値に大きな変化は見られず、含水率に影響されない事を確認した。また、検出波長 480nm 付近における蛍光強度は含水率の減少と共に 35451(counts/20 μs) から 49059(counts/20 μs) に増加した。含水率が低くなると考えられる培養後期に検出波長

480nm 付近の値は増加しており、その増加と比較して蒸留水の値は 3~248(counts/20 μs)と遥かに低い事から、検出波長 480nm 付近の蛍光強度は含水率などにより変化した米の性状が影響していると考えられた。米麹は培養に伴いグルコース生成するため、2、6、10%に調整したグルコース水溶液を用い、グルコースが蛍光強度に与える影響を検討した。その結果、検出波長 630nm の値に大きな変化は見られず、3~248(counts/20 μs)と低い値となった事から、グルコース濃度に影響されない事を確認した。蛍光分光法が様々な清酒麹に利用可能か検討するため、吟醸用麹と醗立用麹を用いて 48 時間培養した米麹を測定した。その結果、吟醸用麹と醗立用麹共に検出波長 630、690nm における蛍光強度の増加が見られたため、本手法は様々な清酒麹に利用可能であると確認された。培養 48 時間の米麹に 2.66W の UV を 10 秒間照射し滅菌処理した米麹を用い、蛍光強度に与える影響を確認した。滅菌処理を施した米麹の蛍光スペクトルを測定した。滅菌する事で検出波長 630、690nm における蛍光強度のピークは消失した。この事から検出波長 630、690nm における値は麹菌の何らかの活性を捉えていると考えられた。また、試験後培地にて培養試験を行ったところ、菌の繁殖は確認されず滅菌処理が的確に行われた事が確認された。

4-3 米麹培養中の蛍光強度と既存の評価手法の関係
米麹培養中の検出波長 630nm の蛍光強度を連続測定し、麹菌体量や酵素活性との関係を検討した。蛍光強度と麹菌体量の関係を計測したところ、蛍光強度、麹菌体量共に培養 20 時間で増加が確認され、その後培養 50 時間までほぼ直線的に増加し、活性の立ち上がりや頭打ちになる時間がほぼ同様であった。そのため、蛍光分光法が製麹工程の麹菌増殖モニタリングに有効であることが示唆された。各指標間の相関を Table1 に示す。蛍光強度と他の指標との関係は R²=0.874~0.971 と非常に高い相関を示した。また、 α -アミラーゼ活性、酸性カルボキシペプチダーゼは活性の立ち上がりや定常期

Table1 各指標間の相関関係

	FES	MW	A	ACP	GA	AG
FES	1.000					
MW	0.971	1.000				
A	0.962	0.919	1.000			
ACP	0.969	0.912	0.979	1.000		
GA	0.925	0.865	0.981	0.974	1.000	
AG	0.874	0.829	0.966	0.926	0.970	1.000

FES:Fluorescence emission strength,
MW:Mycelial weight in rice koji, AA: α -amylase,
ACP:Acid carboxypeptidases, GA:Glucoamylase, AG: α -glucosidase

に入る時間帯が蛍光強度と同様であった。これに対しグルコアミラーゼ活性、 α -グルコシダーゼ活性は培養 26 時間まで活性増加があまり見られず、30 時間頃から急激に活性が増加し 45 時間程度でほぼ安定し、蛍光強度

とはやや異なる経過をとった。このように、蛍光強度は麹菌体量、 α -アミラーゼ活性、酸性カルボキシペプチダーゼと類似した値の推移を示した。しかし、培養終期における蛍光強度の減少や、滅菌する事によるピークの消失から、特定成分を直接的に捉えているとは考えにくく、本手法は生菌が発する生体エネルギーに由来するものが大きく関与していると推察された。そこで、生物体のエネルギー源である ATP と蛍光強度との関係を検討した。ATP と蛍光強度は麹菌の増殖後期まで連動した値の推移を示し、培養終期には蛍光強度と同様に ATP にも値の減少が確認された。以上の事から本手法は、ATP などの生体エネルギーや麹菌の生産物などを総合的に捉えている可能性があると考えられた。そのため、製麹工程だけでなく酒母や醪など酒類製造現場における他の微生物評価にも発展が期待できる。

麹菌を測定するには励起波長 410nm、検出波長 630nm が最適と判断された。殺菌した米麹からは蛍光のピークが消失したため、この蛍光は菌の活性に由来するものと考えられた。また、本手法は含水率やグルコース濃度の影響を受けない事が明らかになった。蛍光強度は麹菌体量や酵素活性と高い相関が得られ、これらを評価するのに利用適性が高いと考えられた。しかし、培養終期における蛍光強度の減少や、滅菌する事によるピークの消失から、米麹中の特定成分を捉えているとは考えにくい。そのため、本手法は ATP などの生体エネルギーを総合的に捉えている可能性が示唆され、他の微生物評価へ発展が期待できると考えており、今後も検討を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

佐々木 隆浩、齋藤 高弘、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
日本醸造協会誌、査読無、108(6)、2013、389-393

〔学会発表〕(計 2 件)

千葉陽介、片岡皆人、齋藤高弘、志賀 徹、星 佳宏、佐々木隆浩、岡本竹己、発光法を用いた清酒の品質評価法の開発、2012 生態工学会年次大会、2012、101-102

千葉陽介、齋藤高弘、志賀 徹、星 佳宏、佐々木隆浩、岡本竹己、化学発光と蛍光を用いた清酒の熟度評価について、農業環境工学関連学会 2012 年合同大会、2012、23

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤高弘 (SAITO, Takahiro)
宇都宮大学・農学部・教授
研究者番号 50221990

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()