

清酒発酵プロセスへのオンラインバイオセンサー導入の要件

近藤正夫・近藤徹弥・西田淑男・深谷伊和男・吉田政次・佐藤知子[※]

清酒醸造業では、杜氏の高齢化や後継者不足が深刻な問題となっており、伝統的な技術の継承が急務となっている。この方策として、清酒発酵プロセスのファジィ制御など高度な技術の導入が試みられ、優れた成果が数多く報告されている¹⁻⁵⁾。しかし、それらの報告においても、制御に必要なアルコール濃度の値などは、オフラインで測定された値が手動で入力されており、自動化のためには改良すべき点が多い。著者らは、この問題を克服する方法としてバイオセンサーの導入をめざした。

バイオセンサーは、酵素バイオセンサーを中心として食品成分の分析で実用化が進んでいるが、計測結果を製造プロセスの制御に反映させる、より高度な利用は未だほとんどなされていない。その理由として、製造プロセスに連結して使用できるオンライン型バイオセンサーが未熟であることがあげられる。バイオセンサーでオンライン計測を実現するためには、信頼性はもちろんのこと、耐久性や雑菌混入の防止など、他の物理、化学センサーに比べ克服しなければならない課題は多い。

以上の観点から、清酒発酵プロセスのファジィ制御にオンラインバイオセンサーを導入するための要件について検討した。

実験方法

1. バイオセンサー

フローインジェクション方式のバイオセンサーである新王子製紙[㈱]製BF-3を使用した。アルコールバイオセンサーは、アルコールオキシダーゼをセラミックスに固定化したリアクター型を、グルコースバイオセンサーは、グルコースオキシダーゼを膜上に固定化した電極装着型を使用した。アルコールバイオセンサー用のリアクターは、内径3mm、長さ30mmの円筒型で、ジーエルサイエンス[㈱]製ユニポートC、30/60メッシュのセラミックスを充填して使用した。

バイオセンサーの操作条件の検討には、採取した清酒もろみを6,000rpmで15分間遠心分離した後、ろ紙No.2を通して得られたろ液の凍結保存試料を使用した。また、アルコールの標品としては、99.5%のエタノールを使用した。

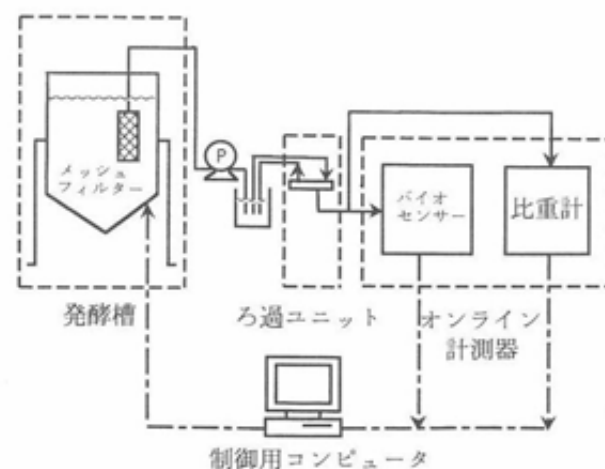
2. 清酒もろみろ液の分析

清酒もろみろ液の浮ひょう法によるアルコール濃度とボーメの分析は、国税庁所定分析法注解⁶⁾に準じて行った。グルコースの酵素法は、和光純薬工業[㈱]製グルコース測定用キット、グルコースBテストワコーを使用して行った。

3. オンラインバイオセンサー

オンラインバイオセンサーを組み込んだ清酒発酵システムの概略図が第1図である。メッシュフィルターとしては、新王子製紙[㈱]製のボアメットフィルター(SUS 316, 孔径20 μ m, 内容積150ml)を、精密ろ過のためのろ過ユニットとしては、旭化成工業[㈱]製(フィルター部直径63mm, 孔径0.2 μ m)を使用した。

ボーメの自動計測は、オンラインバイオセンサーと連動させた京都電子工業[㈱]の固有振動式の比重計DA-300を使用して行った。



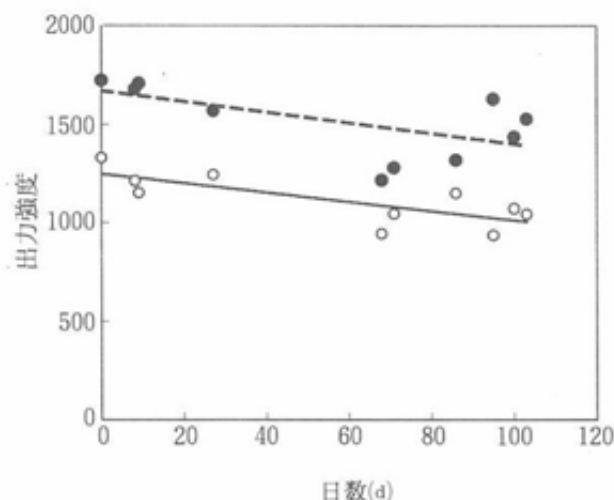
第1図 清酒発酵システムの概略図

※ 梶山女学園大学生生活科学部

実験結果及び考察

1. アルコールバイオセンサーの耐久性

醸造現場の発酵プロセスにバイオセンサーを導入するためには、バイオセンサーの耐久性が優れている必要がある。例えば、吟醸酒の発酵プロセスは約1ヶ月を要するので、それ以上の期間の耐久性が求められる。バイオセンサーの形態には、大別して電極装着型とリアクター型とがある⁷⁾。一般的な電極装着型のアルコールバイオセンサーでは、感度が数日のうちに低下するため、実用に供するためには、耐久性の向上が不可欠である。そこで、より多量の酵素を固定化でき、耐久性の点で有利と考えられるリアクター型アルコールバイオセンサーについて、感度の経日変化を調べた結果が第2図である。リアクター型アルコールバイオセンサーの場合には、グルコースバイオセンサーと同様、3ヶ月以上経過しても80%の感度を保持しており、支障なく実用に供することができることが判明した。

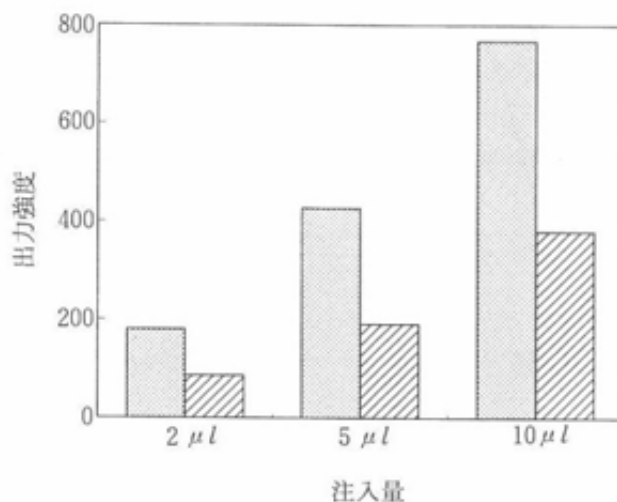


第2図 バイオセンサーの出力強度の経日変化
○アルコール ●グルコース

2. グルコースとアルコールの同時計測

清酒醸造では、アルコールとボーメの測定はルーチンワークとして毎日行われる。このうちボーメは、米の糖化状況を判断するのに利用されるが、直接グルコース濃度が測定できれば、発酵もろみの管理をよりの確に行うことができる。今回使用したバイオセンサーは、アルコール（エタノール）とグルコースの2

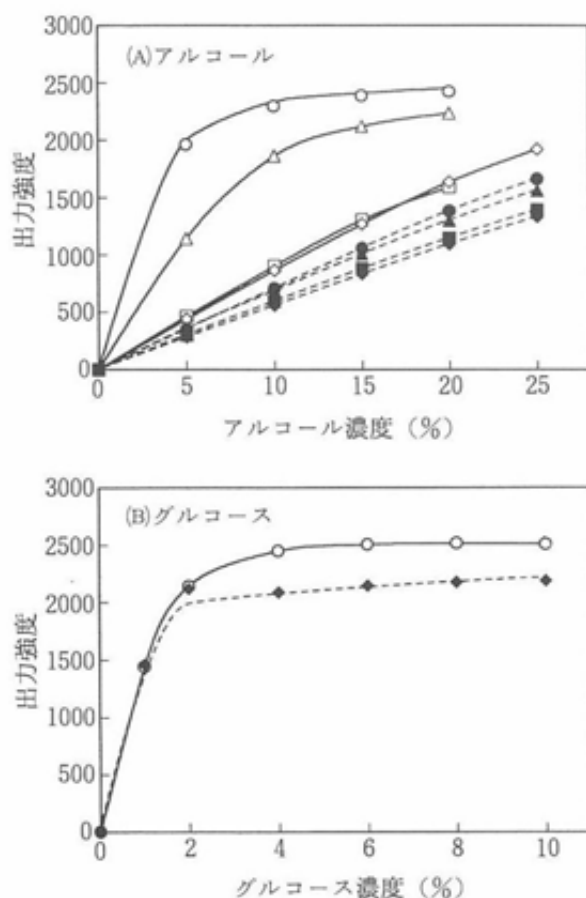
成分を同時に計測できる機能を有している。しかし、オンラインで2成分を同時に計測するためには、アルコール濃度とグルコース濃度がともにセンサーの検出感度範囲（アルコール0～2.0%、グルコース0～0.54%）に入るように調節しなければならない。さらに、清酒製成品あるいは清酒もろみ中のアルコール濃度とグルコース濃度は、バイオセンサーの検出感度範囲に比較するとはるかに高いので、電極の出力強度が小さくなるように工夫する必要がある。これらの目的を実現する方法として、まず試料注入量を減らすことが考えられる。第3図は、自動注入量を2 μ l、5 μ l、10 μ lと変えた時の出力強度を比較したものである。出力強度はおおむね注入量に比例したので、以下の実験では注入量を2 μ lに設定した。



第3図 試料注入量と出力強度の関係

■ アルコール ▨ グルコース

次に、出力強度を調節する方法として、固定化酵素の活性を調節することが考えられる。そこで、溶出用の緩衝液中に酵素活性阻害剤として知られているアジ化ナトリウムを添加してその効果を調べた。第4図は、アジ化ナトリウムの添加濃度を1mMから10mMまで変化させた時の、バイオセンサーの出力強度を示している。アジ化ナトリウム濃度を高めると、25%といった高濃度のアルコール範囲まで直線性が得られた（第4図—(A)）。しかし、グルコースに関しては、アジ化ナトリウムの添加効果はみられなかった（第4図—(B)）。従って、アジ化ナトリウムの添加によって、アルコールとグルコースの両方を、同時に検出感度範囲に入れることはできないことが判明した。そこ



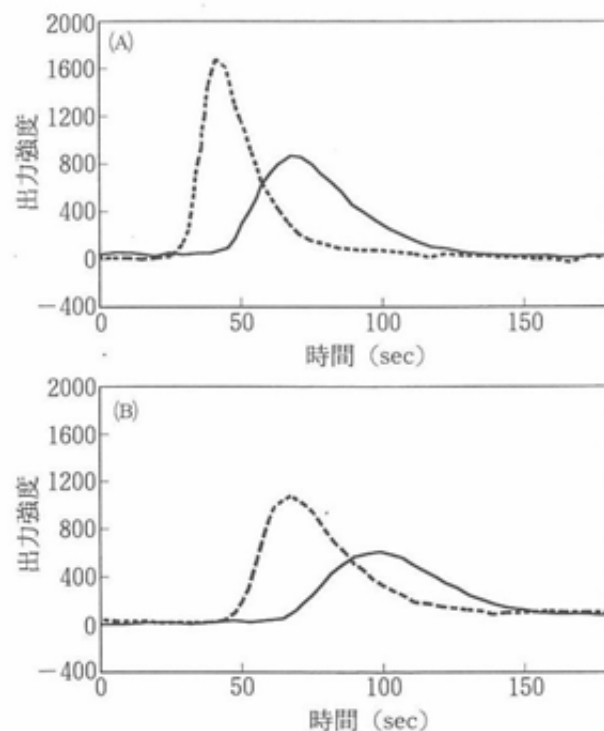
第4図 バイオセンサーの出力強度に及ぼす
アジ化ナトリウムの影響

(A) アルコール (B) グルコース
○ 1 mM △ 2 mM □ 5 mM ◇ 6 mM
● 7 mM ▲ 8 mM ■ 9 mM ◆ 10 mM

で緩衝液中のアジ化ナトリウム濃度は、防腐効果を持たせる目的程度の 1 mM を採用した。

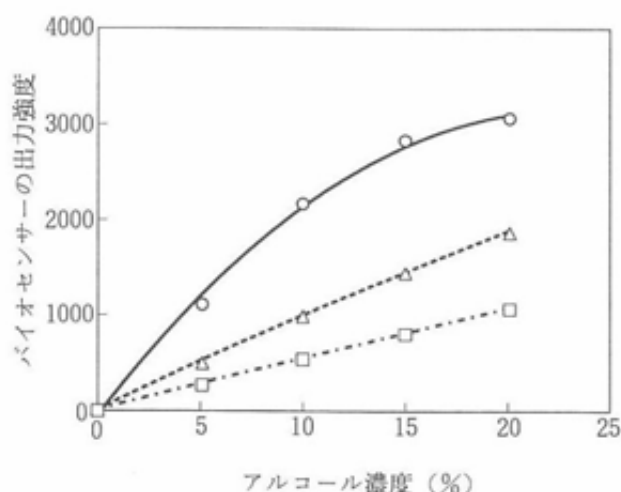
次に、流路の途中にセラミックスのみを充填したダミーカラムを置き、希釈試料が電極に到達するまでの滞留時間を大きくすることによって出力強度を下げることを試みた。第5図は、ダミーカラムの有無による溶出パターンを示している。ダミーカラムを入れることによってピーク時間は遅くなり、それによって出力強度は小さくなった。

さらに、希釈操作を加え検出範囲に来よう調節した。実際の希釈度は、本体流速と希釈液流速とのバランスによって決まる。本体流速を 1.2 ml/min に固定し、希釈液流速を変化させた時の、アルコールバイオセンサーとグルコースバイオセンサーの出力強度に及ぼす希釈液流速の影響を示したのが第6図と第7図で



第5図 溶出パターンに及ぼすダミーカラムの影響

(A) ダミーカラム挿入前 (B) ダミーカラム挿入後
— アルコール — グルコース

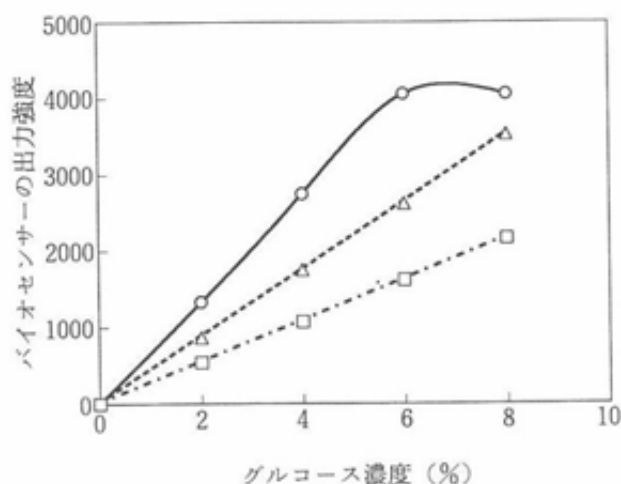


第6図 アルコールバイオセンサーの出力強度に及ぼす
希釈液流速の影響

注入量 2 μ l 本体流速 1.2 ml/min

○ 0.0 ml/min △ 0.4 ml/min □ 0.8 ml/min

ある。希釈操作を加えない時は、10%以上のアルコール濃度、及び6%以上のグルコース濃度で出力強度は飽和した。希釈液流速を 0.4 ml/min に上げると、ア



第7図 グルコースバイオセンサーの出力強度に及ぼす希釈液流速の影響

注入量 $2 \mu\text{l}$ 本体流速 1.2 ml/min

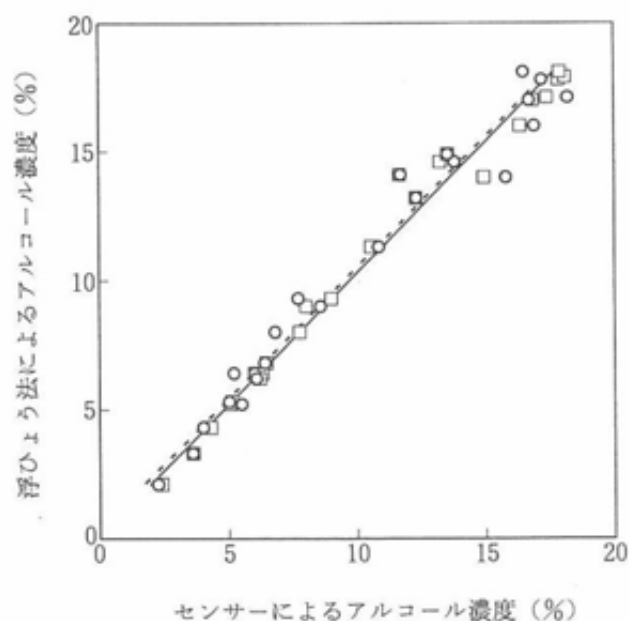
○ 0.0 ml/min △ 0.4 ml/min □ 0.8 ml/min

アルコールもグルコースも次第に直線関係に近づき、 0.8 ml/min では、アルコールで20%まで、グルコースで8%まで完全な直線関係が得られた。これにより、0~20%のアルコールと0~8%のグルコースを同時に計測することが可能となった。

3. バイオセンサーと従来法の比較

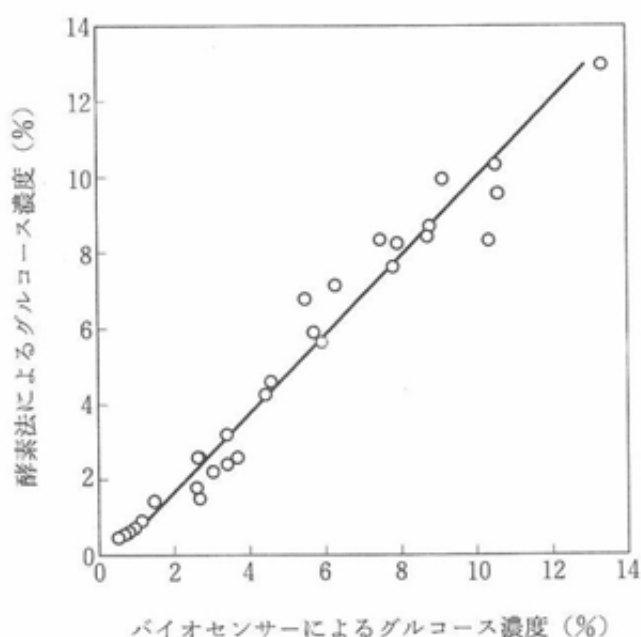
前章までに得られた最適操作条件によって、清酒もろみ液中のアルコールとグルコースを同時計測した。第8図は、アルコールについて、バイオセンサーと浮ひょう法で測定した結果を比較したものである。図には参考のため、近年現場で普及しつつあるアルコール簡易分析用のガスセンサーによる結果も示した。図から明らかなように、バイオセンサーと浮ひょう法の間には良好な相関関係が得られた。ガスセンサーについても同様であった。

第9図は、グルコースについて、バイオセンサーと酵素法で測定した結果を比較したものである。アルコールの場合に比べばらつきが見られるものの、やはり直線関係が得られた。このばらつきの理由としては、バイオセンサーと酵素法では測定時期がずれるため、試料が保存中に、清酒もろみ液中の糖化酵素などの影響を受けたためと考えられる。



第8図 バイオセンサー及びガスセンサーと浮ひょう法によるアルコール濃度の比較

—○— バイオセンサー —□— ガスセンサー



第9図 バイオセンサーと浮ひょう法によるグルコース濃度の比較

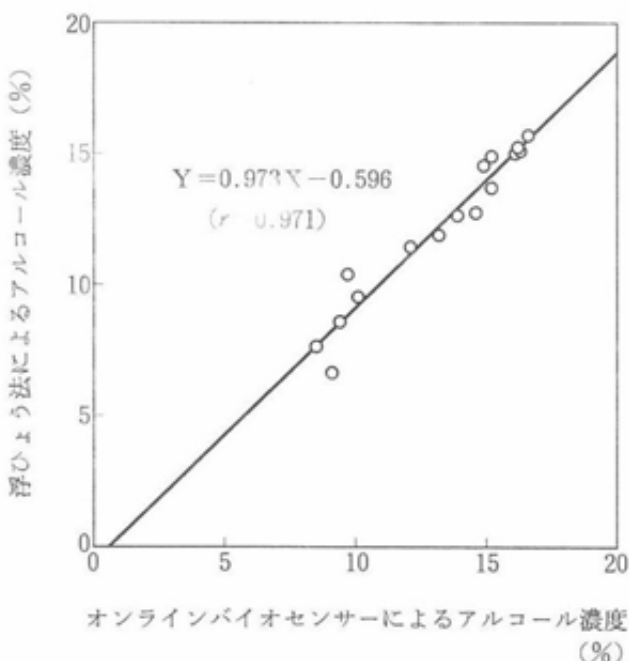
4. オンラインバイオセンサーによる計測

杜氏のもろみ管理のノウハウから抽出された発酵プロセスのファジィ制御ルールでは、出力値であるもろ

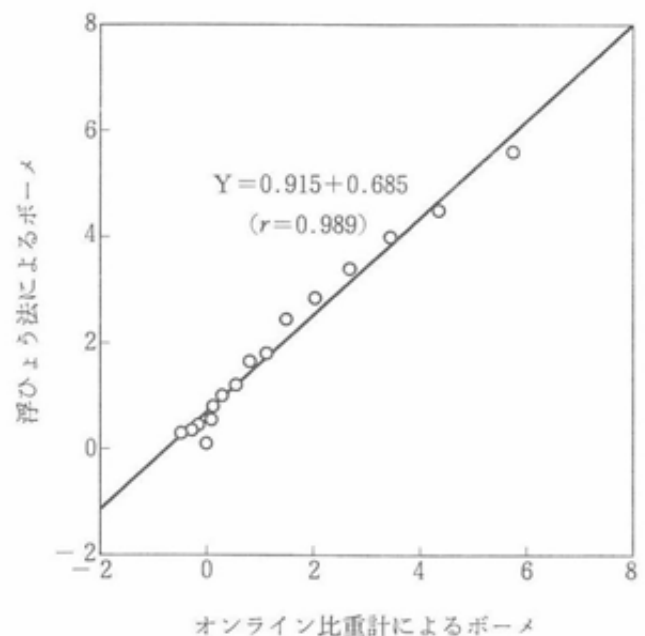
み品温操作量は、入力値であるアルコール濃度とボーメ及びボーメの切れによって決定される。従って、アルコール濃度とボーメがオンラインで自動計測できれば、発酵プロセスのファジィ制御の自動化が実現する。そこで、第1図の清酒発酵システムによって自動的に清酒もろみ液を採取し、ろ液中のアルコール濃度とボーメをオンライン方式で計測することを試みた。その際、メッシュフィルターのみでろ過したろ液を用いた場合には、気泡のからみや計測器の検出部の汚れなど、操作上の問題点が観察された。そこで、メッシュフィルターと計測器の間に、精密ろ過のできる孔径 $0.2\mu\text{m}$ のろ過ユニットを装着して計測を行った。

第10図は、アルコール濃度について、バイオセンサーと浮ひょう法で測定した結果を比較したものである。両者の間には、相関係数 0.971 の $Y=0.973X-0.596$ で表される良好な直線関係が得られた。従って、この相関式から、オンラインバイオセンサーで計測したアルコール濃度を、浮ひょう法によるアルコール濃度に容易に換算することができた。

同様に、オンラインバイオセンサーと連動させた比重計で計測したボーメの値を浮ひょう法と比較した結果が第11図である。図に示すように、相関係数 0.989 の $Y=0.915X+0.685$ で表される良好な直線関係が得



第10図 オンラインバイオセンサーと浮ひょう法によるアルコール濃度の比較



第11図 オンライン比重計と浮ひょう法によるボーメの比較

られた。なおグルコースに関しては、現在のところ制御ルールに含まれていないので、オンライン計測の検証は行わなかった。しかし今後、バイオセンサーがアルコールとグルコースの2成分を同時に計測できる利点を生かし、グルコース濃度の変化も考慮したファジィ制御ルールを構築すれば、実際のもろみ管理により近い制御が実現できるものと考えられる。

以上のように、すでに清酒醸造メーカーでも利用されている実績を持つメッシュフィルター⁸⁾に、さらにろ過ユニットのような精密ろ過のできる装置を加味すれば、バイオセンサーや比重計による自動計測に利用可能なろ液が得られ、アルコール濃度やボーメの値をオンラインで計測できることが判明した。これらのオンライン計測値は、それぞれの相関式から、ファジィ制御ルールで使用されている従来法による分析値にコンピュータ上で容易に換算することができる。この換算値を入力値としてシステムに与えれば、清酒発酵プロセスのファジィ制御が可能となる。すなわち、オンラインバイオセンサー及びそれと連動した密度計を今回検討した条件で作動させれば、清酒発酵プロセスのファジィ制御の自動化が実現する。現在、システムの精度向上など、その完成をめざしている。

要 約

清酒発酵プロセスに、オンラインバイオセンサーを導入する要件について検討し、以下の結果を得た。

- 1) リアクター型のアルコールバイオセンサーは、3ヶ月以上経過しても80%以上の感度を保持しており、耐久性が向上した。
- 2) 自動注入量を2 μ lに減じ、自動希釈操作と滞留時間を調節することによって、0~20%のアルコールと0~8%のグルコースとを同時に計測することができた。
- 3) バイオセンサーによる計測値は、従来の浮ひょう法や酵素法と良好な相関を示した。
- 4) メッシュフィルターと精密ろ過ユニットを組み合わせることによって、清酒もろみろ液のアルコール濃度とボーメをオンラインで計測することができ、ファジィ制御に必要な入力値を与える換算式が得られた。

文 献

- 1) 土屋義信, 小泉淳一, 末成和夫, 手島義春, 永井史郎: 醸酵工学, 68, 123—129 (1990)
- 2) K. Oishi, M. Tominaga, A. Kawato and S. Imayasu: J. Ferment. Bioeng., 72, 115—121 (1991)
- 3) 西田淑男, 深谷伊和男, 高橋伸幸, 花井泰三, 本多裕之, 小林 猛: 生物工学, 72, 267—274 (1994)
- 4) 花井泰三, 本多裕之, 高橋伸幸, 西田淑男, 深谷伊和男, 小林 猛: 生物工学, 72, 275—281 (1994)
- 5) 花井泰三, 西田淑男, 大楠栄治, 本多裕之, 深谷伊和男, 小林 猛: 生物工学, 73, 283—289 (1995)
- 6) 日本醸造協会: 第4回改正国税庁所定分析法注解, P 7—33 (1993)
- 7) 軽部征夫: 食品産業とセンサー, P 7, 光琳 (1991)
- 8) 夾間健次: 醸協, 86, 896—902 (1991)