

利用质谱成像实现米曲中磷脂及葡萄糖的可视化

新闻秀一^{1,2*}、玉田圭大³、Adinda Putri Wisnam¹、广畑修二³、五味胜也⁴、福崎英一郎^{1,2}

关键词：米曲、磷脂、葡萄糖、质谱成像、试样预处理、分解生酶



食品

- 1) 大阪大学研究生院工学研究科生物工程专业
- 2) 大阪大学・岛津 分析创新协作研究所
- 3) 白鹤酒造株式会社
- 4) 东北大学研究生院农学研究科生物产业创生科学专业

■ 摘要

日本酒酿中，米曲是最为重要的因素之一。一般认为，酿酒当中米曲的作用主要是提供淀粉和蛋白质的分解酶。众所周知，做好的米曲组分会对酒质（口味和香味）产生很大影响。然而，对于其质量判断多依靠以往的杜氏经验，并没有获得充分的科学见解，目前是一个仍有开拓余地的领域。杜氏在判断米曲质量时，会将外观和触感等物理因素作为其中的指标。过去曾使用扫描电子显微镜研究米曲的内部结构，但近年来，评价米曲结构与组分关系的研究几乎没有进展。本报告中尝试将可同时观察结构和组分分布的 iMScope™ 应用于发酵领域，将米曲中的结构和组分分布可视化。

1. 引言

本研究进行了米曲中组分空间分布的可视化和有助于评价质量特性的技术开发。正如“一米曲、二酒母、三酿造”所说，日本酒酿造当中米曲是最为重要的要素。一般认为，酿酒中米曲的作用主要是提供淀粉和蛋白质的分解酶，而众所周知，米曲组分会对酒质（口味和香味）产生很大影响。对于其质量好坏的判断多依靠以往杜氏的经验，并不能说获得了充分的科学见解。杜氏在判断米曲质量时，会将外观和触感等物理结构作为其中一个指标。过去曾使用扫描电子显微镜研究米曲的内部结构，但近年来，评价米曲结构与组分关系的研究没有进展，这是现状。

为观察有关米曲结构与质量的组分分布，图 1 所示的质谱分析成像法 (MSI: Mass Spectrometry Imaging) 是最为合适的。在以往关于食品的应用报告中，主要包括将芦笋中的“Asparaptine”以及干姜黄中的“姜黄素”可视化^{1,2}。本应用中，尝试在食品科学应用研究这一新领域，以“发酵”为主题将米曲中的结构和组分分布可视化。利用 MSI 进行解析时，米曲非常易碎，很难直接制作成切片。因此我们研讨了切片制作方法，将从生米到蒸米及米曲制造过程中的代谢产物可视化。

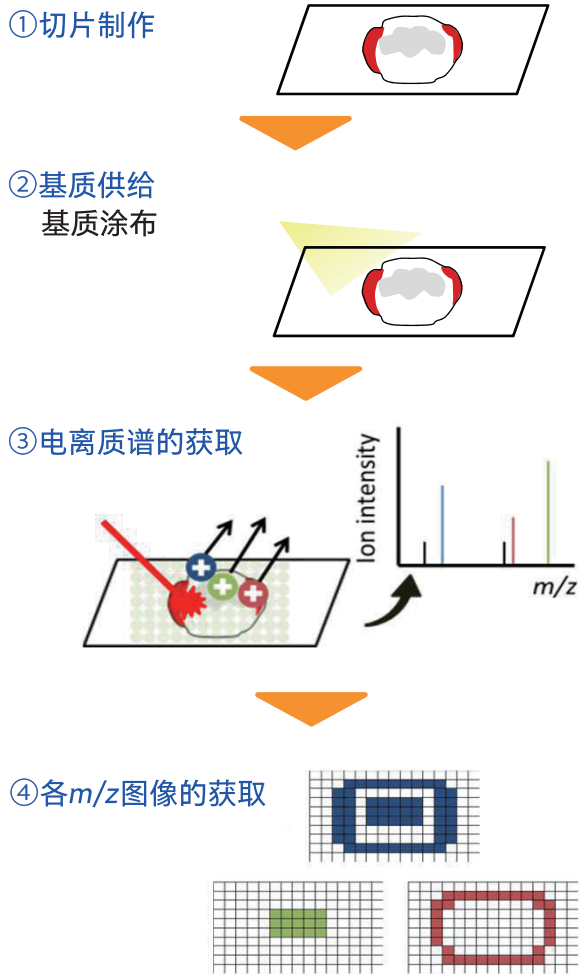


图 1. 质谱分析成像法的工作流程

2. 实验

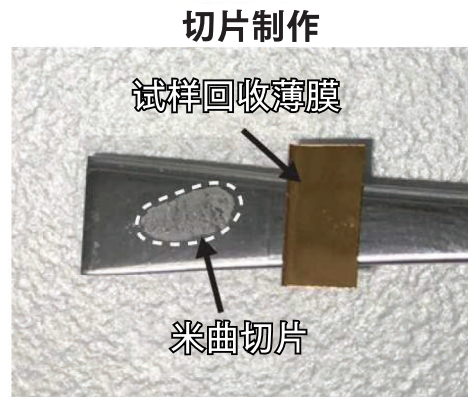
2-1 试剂

包埋剂的羧甲基纤维素购于富士胶片和光纯药，加水至 4% 的浓度，放入恒温槽（70%）一晚使其完全溶解。基质的 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA) 及 N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NEDC) 购于默克集团。

作为溶媒使用的乙腈、异丙醇及甲醇购于富士胶片和光纯药。超纯水采用赛默飞世尔科技公司的 GenPure™ UV-TOC xCAD PLUS 制造的产品。

2-2 切片试样制作

采用了白鹤酒造提供的精米打磨精度 70% 的山田锦蒸米和米曲。另外，生米使用市售大米进行了可视化的尝试。如前文所述，这些试样非常易碎，因而使用低温薄片切片机制作切片，使用粘附膜 (cryolab) 回收所得切片。在切片制备中，每一粒米粒都用 4% 羧甲基纤维素包埋后，在 -80°C 下冻结。切片的厚度为 $20\ \mu\text{m}$ ，得到的薄膜在松浪玻璃制 ITO 涂层玻璃（无 MAS 涂层，表面电阻为 $100\ \Omega/\text{m}^2$ ）上使用从 3M 购买的导电性双面胶固定（图 2）。



试样薄膜安装在 ITO 玻片

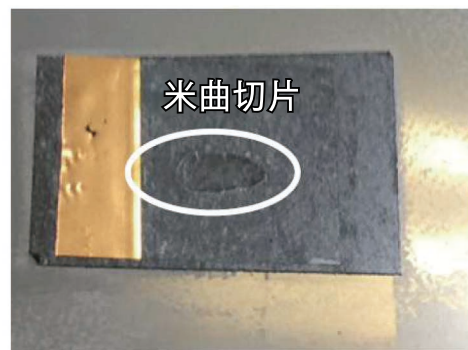


图 2. 米曲切片的制作

2-3 基质供给

检测米切片及米曲切片中的磷脂时，使用图3的基质升华装置 iMLayer™ 将 CHCA 基质升华至试样表面后，喷洒 CHCA 溶液喷雾³。升华后的基质膜厚为 0.5 μm，添加 CHCA 溶液作为溶媒，向乙腈: 异丙醇: 超纯水为 3:1:6 的混合溶液中添加 0.1% 甲酸，制备浓度为 10 mg/mL。此外，众所周知，NEDC 可以高效进行葡萄糖电离，将升华温度设定为 220℃，升华时间设定为 10 分钟，使用 iMLayer 进行升华。升华后，使用 5% 的甲醇进行了升华后重结晶。



图3. 基质升华装置 iMLayer™

2-4 质谱分析成像

使用 iMScope 实施 MSI 测定。激光照射次数为每点 100 次，在空间分辨率为 25 μm 的正离子模式下测定磷脂，在空间分辨率为 50 μm 的负离子模式下测定葡萄糖。正离子模式测定 m/z 范围 400-800，负离子模式测定 m/z 范围 180-230。在全部测定当中，激光强度为 45，检测器电压设定为 2.1 kV。

2-5 MS 成像图像制作

采用质谱分析成像解析软件 Imaging MSSolution™ 及 IMAGEREVEAL™ 进行 MS 数据解析及 MS 成像图像制作。IMAGEREVEAL MS 是采用统计学方法、可进行非靶解析的软件，此外还具有非常优秀的对所得图像进行校正的功能（图像筛选及像素插值），还搭载有类似图像提取功能。本文后半部分的葡萄糖分布就使用 IMAGEREVEAL MS 进行了图像制作。

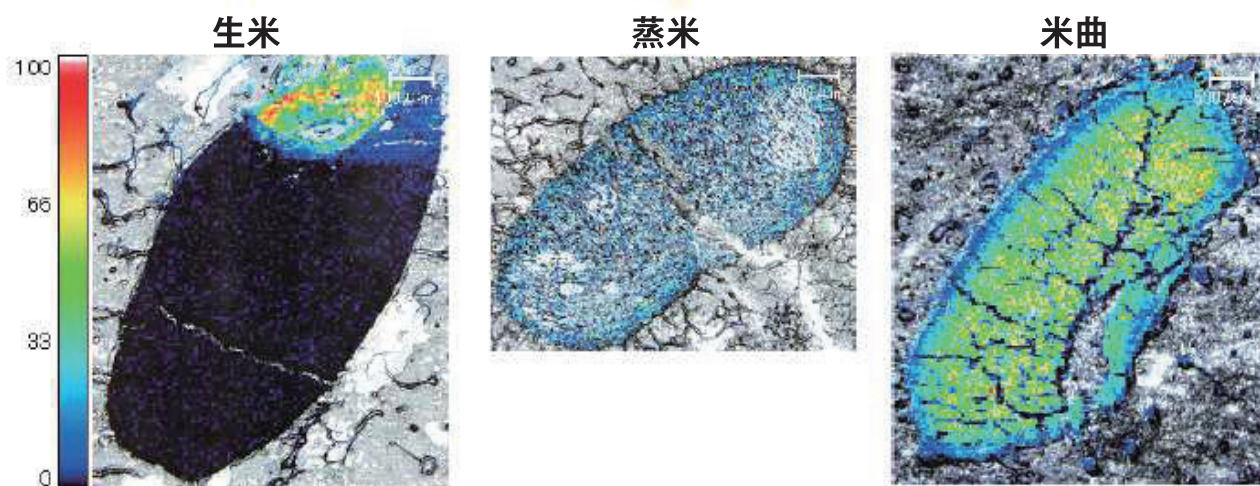


图4. 生米、蒸米、米曲中的磷脂（胆碱）分布

3. 结果

3-1 生米、蒸米、米曲中的磷脂分布

图 4 为生米、蒸米、米曲各自切片当中胆碱的分布，是制曲过程中分布及量发生较大变化的一个示例。生米为进行精米打磨之前的结果，积蓄在胚芽部分。精米打磨后，蒸米中胆碱的峰值强度大幅减小，米曲的内部则呈现非常大的峰值强度。由此可知在米曲的发酵过程（制曲过程）中产生胆碱。可以像这样在制曲过程中使用 MSI，观察量及空间分布的动态变化。

此外，还可将各种磷脂（包括溶血磷脂）在米曲内部的积蓄情况进行可视化（图 5）。特别是发现其趋势的 m/z 496.34 及 520.34，分别为溶血磷脂酰胆碱（LPC）(16:0) 及 LPC(18:2)⁴。另外， m/z 748.35 和 786.30 是由磷脂产生的 MS 图像，暗示了其在米曲内部分布不均匀。这种不均匀性来源于米曲中的曲霉菌的进入，即“种曲入内”。接下来将介绍分解生酶可视化方法的开发及配合 MSI 的结果。

3-2 分解生酶的可视化和 MSI 的融合^{5,6}

破曲是指蒸米表面遍布的曲菌菌丝体的白色斑点，在杜氏目测检查当中，是判断米曲制作情况的指标。以往吉井等人的报告关于破曲可视化是使用扫描电子显微镜（SEM），通过直接将曲菌繁殖过程进行可视化，观察到米曲中 *Aspergillus oryzae* (*A.oryzae*) 的成长特性，对改善制曲做出了贡献⁷。

从观察到的微观领域方面来说，使用 SEM 进行种曲入内可视化是非常好的选择。另一方面，我们认为将整个米曲种曲入内进行可视化的方法和可以获得组分分布信息的方法是非常有用的。为解决这一课题，我们使用 β -葡萄糖苷酸酶（GUS）来实现种曲入内的可视化。

随即确立了 GUS 发现 *A.oryzae* 株，用其制造米曲（以下称为 GUS 米曲），可以明确观察制曲过程中曲菌成长的体系。通过使用 GUS 米曲，可以通过呈色反应将曲霉菌的存在位置可视化，通过融合 MSI，可以得到成分分布信息。通过融合这两种技术，可以实现米曲整体种曲入内的可视化和成分分布的可视化。

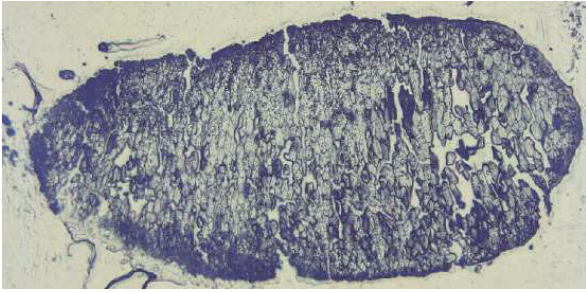
在此，将介绍 GUS 报告系统应用于米曲时所做的准备。GUS 报告系统是在报告初期，为了植物组织内部的菌丝可视化而开发的方法。植物组织的话，为进行显色，一般会浸渍在显色液 5-溴-4-氯-3-吲哚基- β -D-葡萄糖醛酸（X-Gluc）当中。植物组织具有非常结实的细胞壁，即使长时间浸渍在 X-Gluc 当中进行观察，仍可保持形态没有问题。

另一方面，如前文所述，米曲非常易碎，可以说与植物组织的性状完全不同。因此，直接采用现有的显色方式是极其困难的。实际将米曲浸渍在 X-Gluc 溶液当中，时间控制在能够确认显色后，发现米曲会吸水，形态发生较大变化。为解决这一问题，必须改变 X-Gluc 溶液的供给方法。我们设计了一种解决方法，通过向 GUS 米曲切片喷洒 X-Gluc 溶液喷雾，将种曲入内可视化。

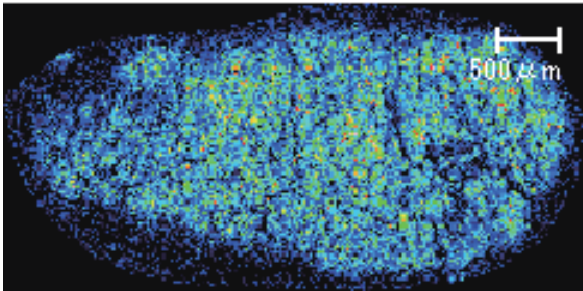
图 6 所示为所得结果。这里采用精米打磨精度 70% 的白鹤锦的精白米进行制曲，在制曲开始后 24 小时、31 小时及 43 小时后提取样本。观察到随着制曲的进行，蓝色从米曲表面浸透至内部。特别是在制曲完成的 43 小时后，不仅在米曲表面检测出十分明显的蓝色，还在内部检测出了蓝色，由此可知曲菌到达了米的内部。

米曲的主要作用之一即是在酿造阶段提供生成酵母营养素的各酶。主要观察的酶是作为酵母成长营养素、生成葡萄糖的 α -淀粉酶或葡糖淀粉酶。同时据报告称， α -淀粉酶可能是影响米曲菌丝侵入的最为重要的酶。

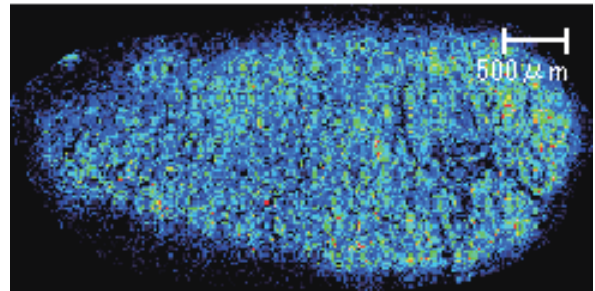
光学视图



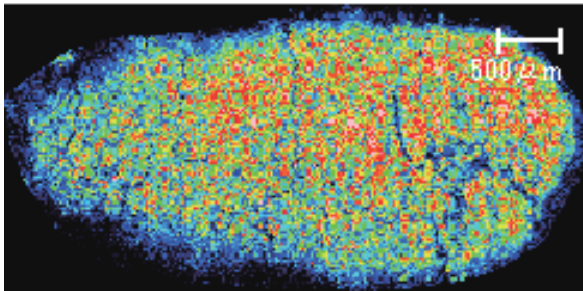
452.24



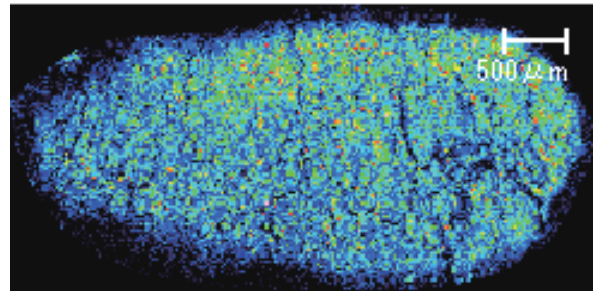
468.31



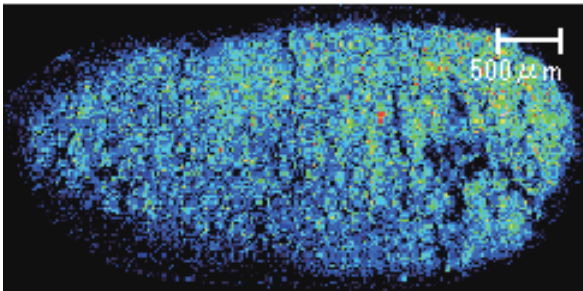
496.34



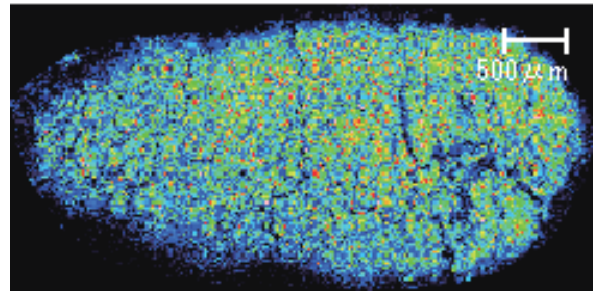
520.34



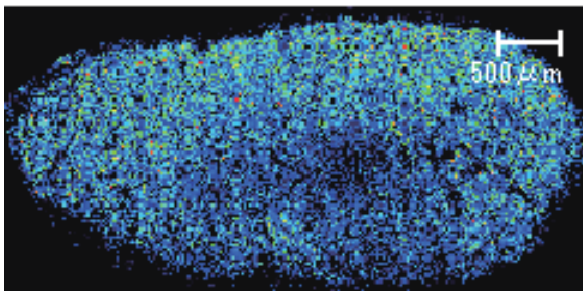
534.30



632.36



748.35



786.30

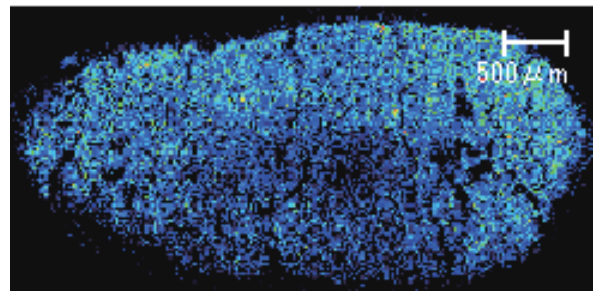


图 5. 各种磷脂在米曲内部的可视化图像

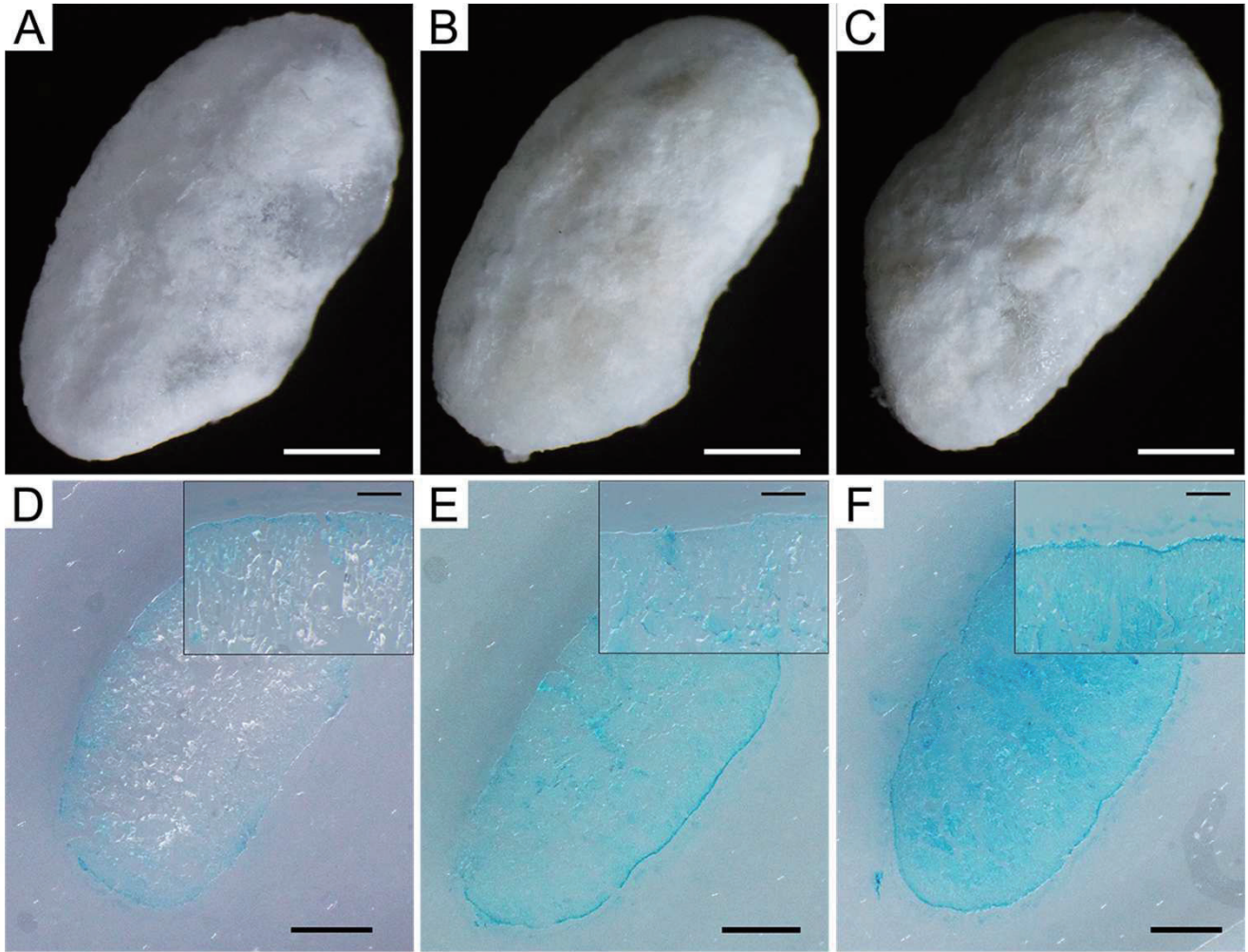


图 6. GUS 米曲中分解生酶的可视化比例尺：200 μm （插入图）、1 mm（AD、BE、CF：制曲开始后 24 小时、31 小时及 43 小时后）

迄今为止的研究表明，制曲后葡萄糖含量增加，但破曲与葡萄糖分布的关系还没有得到确认。在实际制曲过程的各个时间点采样的米曲的质谱中，确认了葡萄糖的峰值强度上升的情况（图 7）。另外，葡萄糖的 MSI 用 NEDC 作为基质，用负离子检测为 $[M+Cl]^- = 215.02$ 。使用 NEDC 的理由是，NEDC 可以提高癌组织中葡萄糖的检测灵敏度⁸。

为了研究 MSI 的葡萄糖分布与 GUS 米曲中种曲入内的关联性，我们使用 GUS 染色的切片及其相邻切片进行了 MSI。也就是说，比较了 GUS 染色图像和得到的葡萄糖粒子强度分布。图 8 所示为所得结果。

观察葡萄糖分布和 GUS 染色图像的重叠部分后可知，从制曲初期到后期，葡萄糖从外侧向内侧呈增加趋势。即可得知分解生酶与葡萄糖分布存在着关系。另一方面，在此次试验中发现，有些部分如黑色箭头所示，X-Gluc 的蓝色较深，葡萄糖强度较高，也有些部分虽然有分解生酶，但葡萄糖强度较低，如黑色圆形所示。由此可知通过种曲入内产生的葡萄糖量在不同部位呈现多样性。今后，通过与各种代谢产物（氨基酸、糖、糖醇等）相结合进行讨论，可以在化学方面进一步理解种曲入内的现象。

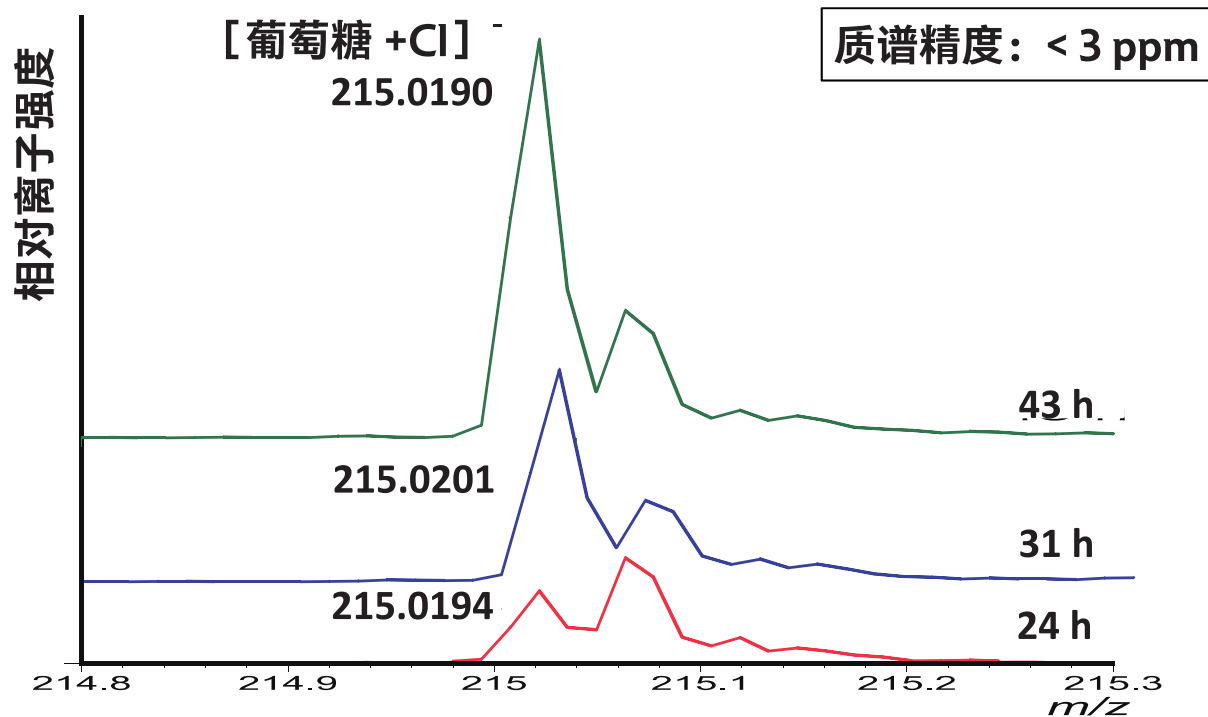


图 7. 将 NEDC 作为基质所得的葡萄糖峰值随时间变化

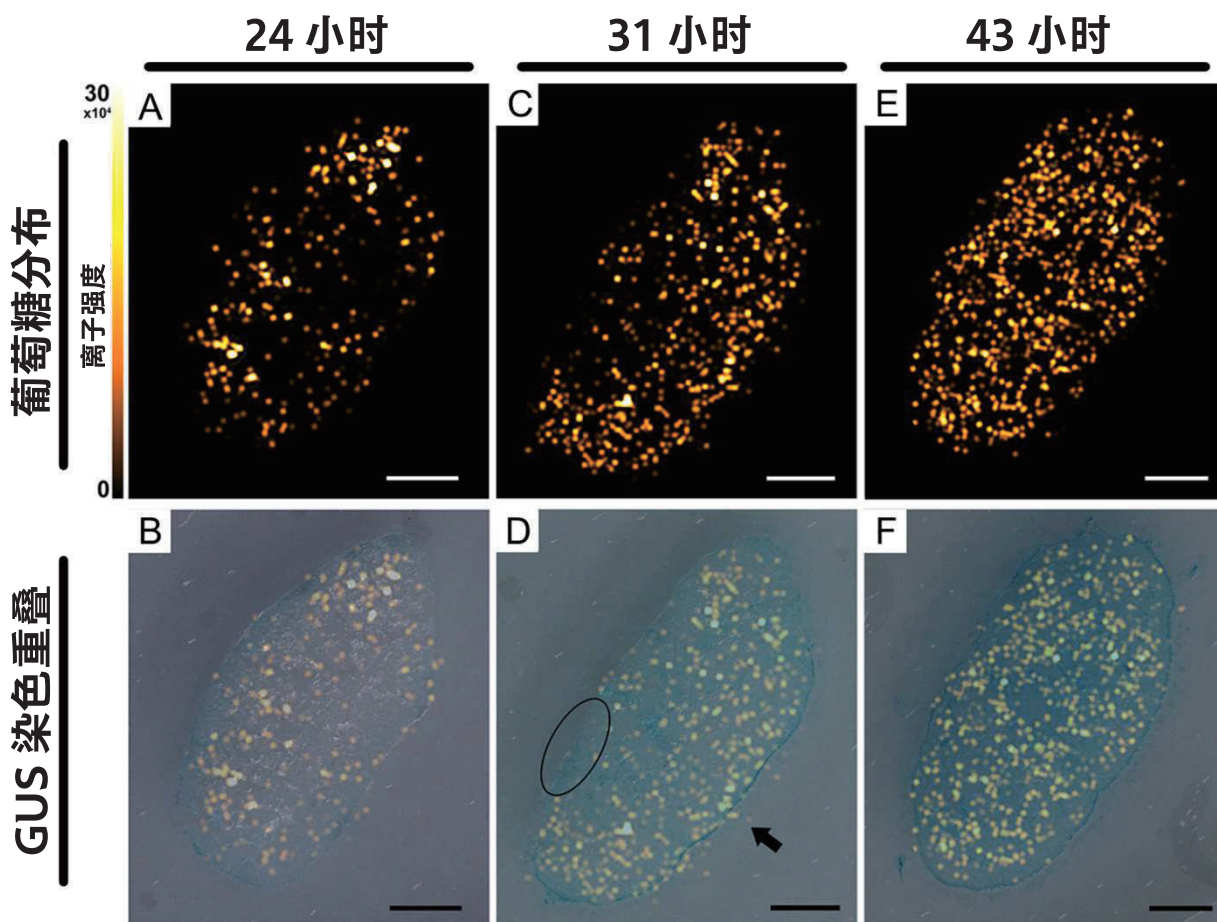


图 8. GUS 米曲中葡萄糖 ([M+Cl]⁻) 的可视化比例尺: 1 mm

此报告将焦点聚焦于葡萄糖，介绍了种曲入内与葡萄糖分布的变化，而所生成酶的扩散范围和活性还受米粒性质等其他因素的影响。可以期待这些新的可视化技术（GUS 米曲和 MSI 融合）将对米曲及其他曲原料产品的制曲方法带来改善。



图 9. iMScope™ QT

4. 结论

本研究使用山田锦蒸米和米曲对磷脂的分布进行可视化分析，另外使用白鹤酒厂独有的酒米白鹤锦将种曲入内和葡萄糖分布可视化。结果显示在制曲过程中部分磷脂发生变化并被可视化。另外，白鹤锦中制造出 GUS 米曲的结果表明，种曲入内与葡萄糖分布具有相关性。总结这些新的可视化技术可以帮助我们理解米曲及其他曲源产品的制曲过程，改善制曲方法。另外，可以在微观部位进行光学显微镜观察和在显微镜下进行质谱分析的成像质谱显微镜 iMScope 今后将被应用于各种各样的曲的分析，可以为发酵领域带来新的科学知识。

iMScope TRIO™ 的后继机 iMScope QT (图 9) 于 2020 年 6 月发布。继承了 iMScope TRIO 的显微镜观察功能和空间分辨率，质量分辨率，检测灵敏度，分析速度提高，分析更容易。另外，由于质谱分析的范围也越来越广，MSI 的应用前景令人期待。

5. 参考文献

1. 三好航平、榎本阳介、福崎英一郎、新闻秀一
岛津应用笔记 (No. 57)
2. 新闻秀一、佐川岳人
岛津应用笔记 (No.63)
3. S. Shimma, Y. Takashima, J. Hashimoto, K. Yonemori, K. Tamura, and A. Hamada
J. Mass Spectrom., 2013, 48, 1285.
4. N. Zaima, N. Goto-Inoue, T. Hayasaka, M. Setou,
Rapid Commun. Mass Spectrom., 2010, 24, 2723.
5. A. P. Wisman, Y. Tamada, S. Hirohata, K. Gomi, E. Fukusaki, S. Shimma
J. Biosci. Bioeng., 2020, 129, 296.
6. A. P. Wisman, 玉田佳大, 广畑修二, 五味胜也, 福崎英一郎, 新闻秀一,
日本酿造协会杂志 (in press)
7. 吉井美华, 荒卷功,
日本酿造协会杂志, 2001, 96, 806.
8. J.Wang et al.,
Anal. Chem., 2015, 87, 422.

iMScope、iMScope TRIO、iMLayer、Imaging MS Solution 和 IMAGEREVEAL 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标。
GenPure 是 Thermo Fisher Scientific 的商标。
本资料中出现的其他公司名称、产品名称、服务标记和徽标是其各公司的商标和注册商标。
此外，TM、® 标志可能未在文中明确说明。

岛津应用云



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2020 年 09 月