

研究ノート

原料米の違いが発酵法によるエチル- α -D-グルコシドの生成効率に与える影響

Effect of the differences in the raw materials rice on the fermentation

production efficiency of ethyl - α -d- glucoside

坊垣隆之^{*1,3}、相良純一²、尾関健二^{1,2}

(投稿日：2016.8.9、受理日：2016.11.8)

原料米としてうるち米（アミロース 20%前後とアミロペクチン 80%前後）ともち米（アミロペクチン 100%）を用いてエチル- α -D-グルコシド（以下 α -EG）の生成効率を比較すると、清酒発酵（15℃、20 日間）では 1.3 倍、みりん発酵（30℃、20 日間）では 1.8 倍もち米の方が生成効率が高くなった。 α -1,4 結合のマルトースもしくは α -1,6 結合のイソマルトースからの α -EG 生成効率（50℃、2 日間）はマルトースの方が 1.2 倍高くなった。発酵法による α -EG の生成には原料米のデンプン質の糊化やアミラーゼ系酵素の作用機構の影響があると考えられた。

キーワード：エチル- α -D-グルコシド、うるち米、もち米、アミロース、アミロペクチン

1. 緒言

エチル- α -D-グルコシド (α -EG) は清酒中に水、エタノール、グルコースに次いで 4 番目に高含有される成分であり 1971 年に発見された[1]。その後の研究で並行複発酵によって醸造される清酒に 0.5%(w/v)前後、微生物による発酵が関与しない酵素反応による醸造法に相当するみりん中でもほぼ同量含有することが報告されている[2]。清酒中で α -EG は、マルトオリゴ糖やデキストリンからエタノールをアクセプターとして麴由来の α -グルコシダーゼの糖転移反応により生成する[3]。この反応の基質となる糖類は原料米のデンプン質が麴由来の α -アミラーゼによって分解されることで生成し、エタノールはデキストリンやオリゴ糖からグルコアミラーゼによって生成したグルコース、マルトース、マルトトリオースなど低分子の糖を酵母が資化しエタノール発酵することで生成する。従って、ビールなど

の単行複発酵、ワインなどの単発酵では麴を使用しないので α -EG は生産されない[2]。また、 α -EG は清酒の呈味に関与することが報告されているが、それだけではなく、肌荒れ改善効果や保湿効果が確認されており[4]、化粧品素材として利用されている。

我々はこれまでに清酒発酵時に麴量を減らし、 α -アミラーゼと α -グルコシダーゼを酵素剤として添加することにより、 α -EG 濃度が 3%を超える清酒を生産可能であることを示した。この時 α -EG 生成反応の基質であるオリゴ糖の分解を抑制するために、グルコアミラーゼは正常なエタノール発酵に必要な最低限のグルコースが供給可能な量を添加した。また、この清酒を 2.5% α -EG に調整した後、肌に塗布し、保湿効果を示すことを報告した[5]。米および麦焼酎製造においても、同様な考え方でアミラーゼ系酵素剤のバランスを検討することにより、焼酎製造時の醪においてそれぞれ 2%を超える α -EG が製造できた。蒸留した焼酎には α -EG は検出されず、官能評価でも米および麦ともに品質的にそれぞれのコントロールと差がなく α -EG による官能への影響はなかった。また 2.5% α -EG を含有する米焼酎の蒸留残渣には、清酒と同様に保湿効果があり、これまで廃棄していた蒸留残渣が有効活用できる技術開発を報告した[6]。

先行研究ではうるち米ともち米からの α -EG の発酵法による生成効率を比較した

¹ 金沢工業大学大学院工学研究科バイオ・化学専攻

² 金沢工業大学ゲノム生物学研究所

³ 大関株式会社総合研究所

*著者連絡先

所在地：663-8227

兵庫県西宮市今津出在家町 4-9

TEL: 0798-32-2169、FAX: 0798-34-7475

e-mail: takayuki.bougaki@ozeki.co.jp

報告はなかった。うるち米ともち米ではデンプン中のアミロースとアミロペクチン含量が異なるために物性に違いが生じる。その物性の違いがデンプンから酵素作用によって生じるオリゴ糖等の生成に影響を与え、オリゴ糖等を基質とする α -EG の生成反応に影響するのではないかと考えられた。そこで、本研究ではうるち米ともち米を原料として、清酒発酵とみりん発酵における α -EG 生成効率を比較した。さらにマルトースまたはイソマルトースとエタノールを基質とした酵素反応による α -EG 生成効率を比較することにより、発酵法による原料米の違いによる α -EG の生成の特徴を明らかにした。本研究で明らかになった α -EG 生成に対する原料米の違いが与える影響をさらに詳しく研究することで α -EG の効率的な生産が可能になり、化粧品やサニタリー用品等に広く利用されることが期待される。

2. 実験方法

(1) 清酒の小仕込み

清酒の小仕込みは、掛米の原料米としてうるち米（精米歩合 70% の α 化米；徳島製麹（株））ともち米（市販品）を蒸して使用した。麴米は精米歩合 70% の乾燥麴（徳島製麹（株））を使用した（表 1）。 α -アミラーゼ（AA）剤としてスミチーム L（新日本化学工業（株）12,000 U/g）を 1,000, 1,500 U または 2,000 U と α -グルコシダーゼ（AGL）剤としてトランスグルコシダーゼ「アマノ」（天野エンザイム（株）300,000 U/g）1,500 U を併用した。酵母は協会 7 号酵母 5.6×10^6 cells/mL を使用し、15°C で 20 日間発酵した後、遠心分離で清酒と酒粕に分離した。清酒の分析は前法[4]に従い α -EG、エタノールおよびグルコースを測定した。

表 1 清酒の仕込み配合

原料	添加量
総米	22.75 g
掛米	20.5 g
麴米	2.25 g
汲水	38.0 ml

2.2 みりんの小仕込み

みりんの小仕込みは、清酒と同様に掛米としてうるち米ともち米をそれぞれ用い、40%エタノールおよび乾燥麴と AA 剤 600 U と AGL 剤 0, 750, 1,500, 3,000 または 4,500 U を併用し、30°C で 20 日間発酵した（表 2）。

表 2 みりんの仕込み配合

原料	添加量
総米	54.5 g
掛米	50.0 g
麴米	4.5 g
40% エタノール	40.0 ml

(3) 酵素反応による α -EG の生成効率

マルトースまたはイソマルトースとエタノールを基質とした酵素反応（AGL 剤 1,200 U）による α -EG の生成効率を調べる目的で、表 3 の配合で 50°C、2 日間反応した。

表 3 酵素反応液組成

成分	添加量
80% エタノール	0.5 ml
50% マルトース/イソマルトース	0.4 ml
8% AGL 剤	50 μ l
1 M クエン酸緩衝液 pH 5.0	50 μ l
精製水	90 μ l

3. 結果および考察

(1) 清酒の小仕込み

酵素剤の配合比率を変化させた小仕込み試験を行い α -EG を高生産する条件を検討した。清酒醪を遠心分離で固液分離し、その上清である清酒のエタノール濃度を測定した結果を図 1 に、 α -EG 濃度を測定した結果を図 2 に示す。AA 剤添加の 3 区分共にもち米を用いた発酵でエタノール濃度は 12% を超えていたが、うるち米を用いた場合のエタノール濃度は約 14% であり、うるち米の方がエタノール発酵が進み易いことが分かった。AA 剤と AGL 剤を組合せた清酒の小仕込みでは、AA 剤 1,000 U と AGL 剤 1,500 U を併用した場合に、もち米を原

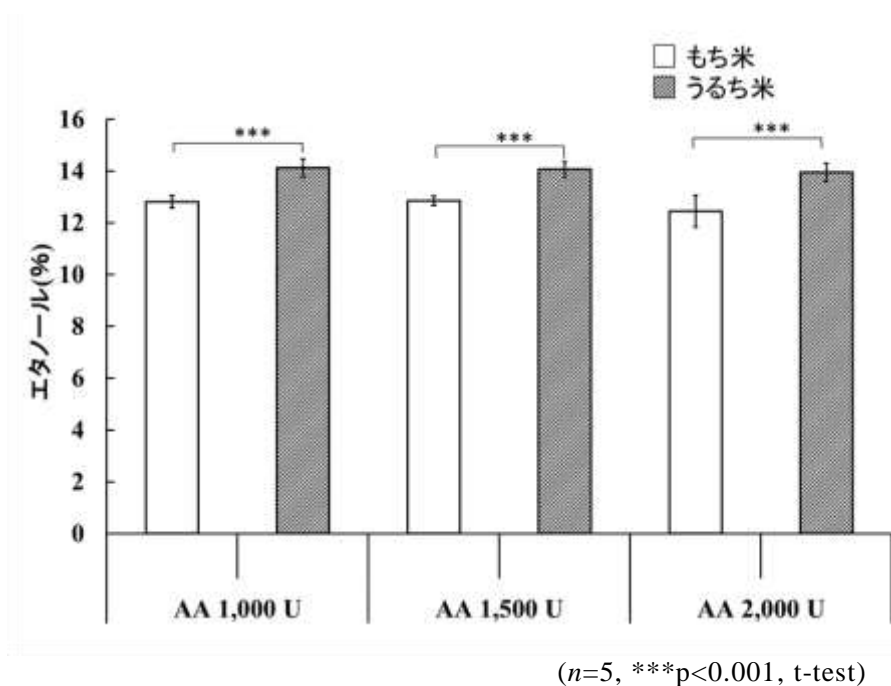


図1 もち米またはうるち米を用いて醸造した清酒のエタノール濃度仕込みは表1の配合で行いすべての試験区に1,500 UのAGL剤を添加し、さらに1,000、1,500または2,000 UのAA剤を添加して15°Cで20日間発酵した。

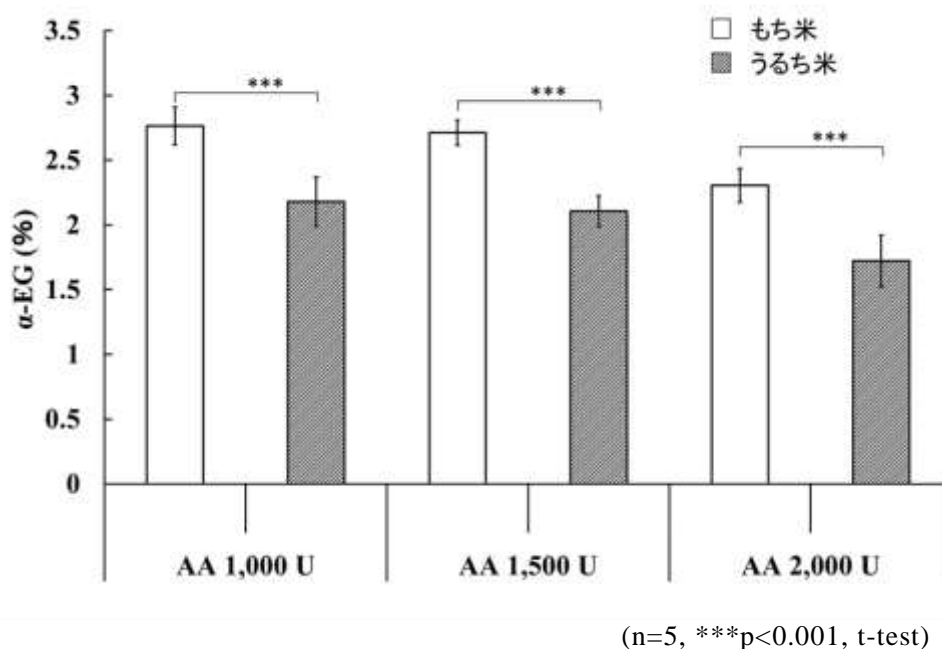


図2 もち米またはうるち米を用いて醸造した清酒のα-EG濃度仕込みは表1の配合で行いすべての試験区に1,500 UのAGL剤を添加し、さらに1,000、1,500または2,000 UのAA剤を添加して15°Cで20日間発酵した。

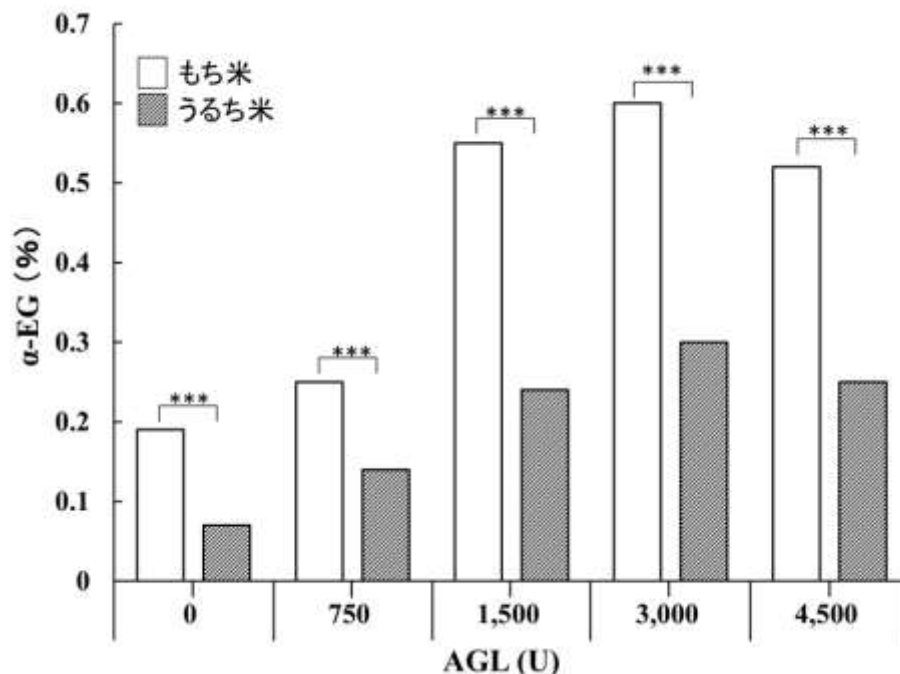
料米とする仕込みでα-EGは2.8%生産され、うるち米を用いた仕込みで2.2%ともち米ではうるち米の1.3倍程度α-EGが発酵生産できることが分かった。

エタノール濃度が低いもち米からの α -EG生産量の方が高くなった。岡らは糖濃度一定の場合、エタノール濃度が高くなると生成する α -EGは多くなることを報告しており[7]、本研究の結果とは異なっている。このことから、原料米のデンプン質の組成の違いによって、糖化酵素の分解によるマルトオリゴ糖の生成量においてもち米がうるち米を上回り、それによってもち米の α -EG生成量がうるち米を上回った可能性がある。また、エタノール濃度はもち米の方が低かったが、転移反応による α -EGの生成にエタノールが利用されたことも一因と考えられ、今後の検討課題である。AA剤の添加量が多くなってもエタノールの生成量に差は無いが、 α -EGの生成量は減少した。これは本研究で使用したAA剤には若干のグルコアミラーゼ活性が含まれているため、添加量が増加することによってマルトオリゴ糖のグルコースへの分解が進み易くなり、 α -EG合成の基質が減少したためと考えられる。また酵母はグルコース、マルトース、マルトトリオースを資化しエタノール発酵が可能のためエタノールの生成量

には影響が少なかったと考えられる。

(2) みりんの小仕込み

酵素剤の配合比率を変化させ α -EGを高生産するみりんの小仕込み条件を検討した。みりん醪を遠心分離で固液分離し、その上清の α -EG濃度を測定した結果を図3に、グルコース濃度を測定した結果を図4に示す。AA剤600UおよびAGL剤3,000Uを用いた時に、原料米の種類に関係なく α -EG及びグルコースの濃度が高くなった。 α -EGはもち米を用いた仕込みで0.6%生産され、うるち米を用いた仕込みで0.32%であり、もち米を用いた方が約1.8倍 α -EGが効率良く発酵生産できることが分かった。その時、グルコースももち米の方が高生産であった。清酒の仕込みは15℃であるが、みりんの仕込みは発酵温度が30℃であるため酵素反応が進みやすいと考えられた。しかし、みりんの仕込み結果では α -EG濃度は清酒の仕込みの約20%以下であり、マルトオリゴ糖の生成速度とマルトオリゴ糖を基質とした α -EGの生成速度及びマルトオリゴ糖のグルコースへの分解速度のバランスが悪い



(n=5, ***p<0.001, t-test)

図3 もち米またはうるち米を用いて醸造したみりんの α -EG濃度
仕込みは表2の配合で行いすべての試験区に600UのAA剤を添加し、さらに0、750、1,500、3,000または4,500UのAGL剤を添加して30℃で20日間発酵した。

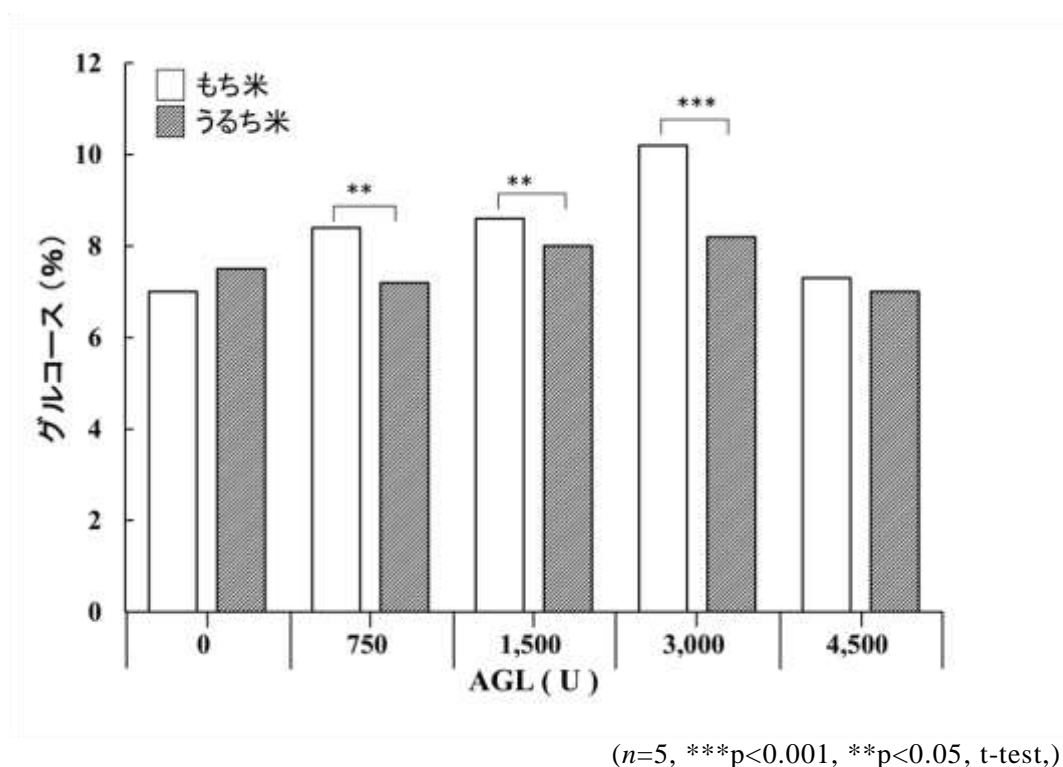


図4 もち米またはうるち米を用いて醸造したみりんのグルコース濃度
仕込みは表2の配合で行いすべての試験区に600UのAA剤を添加し、さらに0、750、1,500、3,000または4,500UのAGL剤を添加して30℃で20日間発酵した。

と考えられた。エタノール発酵の進行に伴い、エタノール基質が徐々に供給される並行複発酵方式の清酒仕込みの方がα-EGの発酵生産には有利な発酵方式であると考えられた。

(3) 酵素反応によるα-EGの生成効率

マルトースまたはイソマルトースとエタノールとの酵素反応条件を検討した結果を表4に示す。グルコース濃度とα-EG濃度の差が小さいことから、マルトースとイソマルトースの分解反応の大部分は、分解によってグルコースとα-EGが生じるエタノールをアクセプターとした糖転移反応であり、分解によってグルコース2分子が生成する加水分解反応は僅かであったと考えら

れる。マルトースまたはイソマルトースを糖基質とした場合のα-EGの濃度は、それぞれ2.76%と2.32%であった。これはα-1,4グルコシド結合のマルトースからの糖転移反応の効率がα-1,6結合と比較して1.2倍程度高いことを示す結果であった。清酒仕込みとみりん仕込みではアミロース(α-1,4結合)とアミロペクチン(α-1,4結合およびα-1,6結合)を含有するうるち米と比較して、アミロペクチンのみを含有するもち米を原料米とする方がα-EG生成効率が1.3倍と1.8倍それぞれ高くなった。試薬のマルトースとイソマルトースからの生成を比較した実験において、マルトース(α-1,4結合)の方がイソマルトース(α-1,6結合)よりα-EGの生産性が高い結果を考慮すると、本

表4 マルトースまたはイソマルトースとエタノールからのα-EGの生成

基質	α-EG (% (w/v))	グルコース (% (w/v))
マルトース	2.76	2.98
イソマルトース	2.32	2.48

研究における酵素剤を添加した清酒仕込みとみりん仕込みにおいて α -EG の生成に糖基質であるオリゴ糖の α -グルコシド結合の位置の違いが酵素反応に直接関与している可能性は低いと考えられた。清酒やみりん等の醸造に原料として使用される穀類は予め加熱し糊化することで酵素によって消化され易くする必要がある。吉井らはうるち米ともち米の糊化度の指標となる酸溶解度を比較し、もち米が高く、うるち米が低いことを報告しており[8]、糊化度の違いがデンプンからのマルトオリゴ糖の生成に影響している可能性が考えられた。清酒醸造において、低アミロース米の老化蒸米はうるち米のそれよりも消化性が高いことが報告されている[9]。またアミロース含量が多くアミロペクチンの側鎖が長いほど老化（消化性の低下）が起こり易いことが報告されている[10, 11, 12]。従って、もち米アミロペクチンに存在しない長鎖のアミロペクチン成分を持つ[13]うるち米はもち米よりも老化し易いと考えられる。そのためデンプンが酵素による分解を受け難くなったことで、うるち米の α -EG 生成効率がもち米と比較して低くなった可能性が考えられるが、もろみにおけるデンプンの老化が α -EG 生成効率に与える影響については今後の検討課題である。イソマルトースから α -EG が生成することが明らかになったことから、清酒醸造においてマルトオリゴ糖が減少し、イソマルトオリゴ糖が増加する発酵後期には、イソマルトオリゴ糖が α -EG 生成の糖基質となっている可能性があると考えられ今後の研究で明らかにしたい。

これまで α -EG は新規機能性の甘味料としての研究[14]、紫外線照射時の荒れ肌改善による保湿効果[4]、消化吸収で α -EG としてのラット体内動態の研究[15,16]などが報告されている。また、ヒトの線維芽細胞の細胞増殖賦活化によってコラーゲン量が増加する結果が培養細胞を用いた実験で得られており[17]、今後さらに α -EG の各種機能性研究が行われることで、今後内外美容素材としての商品展開が期待できる。本研究で明らかになった原料米の違いと α -EG 生成効率の関係をさらに詳しく研究することで発酵法による α -EG の効率的な生産方法を確立したい。

文献

1. Imanari, T. and Tamura, Z.: The Identification of α -Ethyl Glucoside and Sugar-alcohols in *Sake*, *Agric. Biol. Chem.*, 35, 321-324 (1971)
2. 岡智, 佐藤信: 清酒の風味構成に対するエチル α -D-グルコシドの寄与, *農芸化学*, 50, 455-461 (1976)
3. 佐藤信, 大場俊輝, 小林健: 酒類のエチル α -D-グルコシドの定量 醸協, 77, 393-397 (1982)
4. Hirotsune, M., Haratake, A., Komiya, A., Sugita, J., Tachihara, T., Komai, T., Hizume, K., Ozeki, K. and Ikemoto, T.: Effect of Ingested Concentrate and Components of Sake on Epidermal Permeability Barrier Disruption by UVB Irradiation, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 948-952 (2005)
5. 坊垣隆之, 相良純一, 尾関健二: α -エチル-D-グルコシド高含有清酒の製造法の開発とその保湿効果, *食品・臨床栄養 (e-Journal)*, 10-16 (2015)
6. Bogaki, T. and Ozeki, K.: High-yield production of ethyl α -D-glucoside in shochu brewing and evaluation of its functionality, *J. Bio. Macromol.*, 15, 41-50 (2015)
7. 岡智, 岩野君夫, 布川弥太郎: 清酒醸造過程におけるエチル α -D-グルコシドの生成, *本農芸化学*, 50, 463-468 (1976)
8. 吉井洋一, 有坂将美, 城斗志夫, 早川利郎: 低アミロース米の理化学的特性, *食品工学*, 44, 353-360 (1997)
9. 水間智哉, 古川幸子, 清川良文, 若井芳則: 低アミロース米の酒造適正, *醸協*, 98, 293-302 (2003)
10. 若井芳則, 水間智哉, 宮崎紀子, 長野知子, 柳内敏靖: 酒造適正への原料米諸性質の関与, *生物工学*, 75, 99-109 (1997)
11. Okuda, M., Aramaki, I., Koseki, T., Satoh, H. and Hashizume, K.: Structural characteristics, properties, and *in vitro* digestibility, *Cereal Chem.* 82, 361-368 (2005)
12. Okuda, M., Hashizume, K., Aramaki, I., Numata, M., Joyo, M., Goto-Yamamoto, N. and Mikami, S.: Influence of starch characteristics on digestibility of steamed rice grains under sake making conditions, and rapid estimation method of digestibility by physical analysis, *J. Appl. Glycosci.*, 56, 185-192 (2009)
13. 檜作進: 米澱粉の特性について, *醸協*, 89, 94-99 (1994)
14. 芳川憲司, 池田潔昭, 谷川弘晃, 山本一也, 宮本博文, 岡田茂孝: エチル- α -グルコシドの大量生産方法と食品への応用, *食品工学*, 41, 878-885 (1994)
15. Mishima, T., Hayakawa, K., Ozeki, K. and Tsuge, H.: Ethyl α -D-Glucoside Increases Urine Volume and Causes Renal Morphologic Changes in Rats, *Nutrition*, 21, 525-529 (2005)
16. 三嶋智之, 尾関健二: 清酒中に含まれる配糖体の機能性と代謝, *FFI Journal of Japan*, 219, 275-280 (2014)
17. 坊垣隆之, 尾関健二: 第40回香粧品学会大会講演要旨集, 40, 34 (2015)

Note

Effect of the differences in the raw materials rice on the fermentation production efficiency of ethyl - α -D- glucoside

Takayuki Bogaki^{1, 3,*}, Junichi Sagara², Kenji Ozeki^{1, 2}

¹Graduate Program in Bioscience and Applied Chemistry, Graduate School of Engineering,

²Genome Biotechnology Laboratory, Kanazawa Institute of Technology, ³General Research Laboratory, Ozeki Corporation.

*Corresponding author: Address: 4-9 Imazu, Dezaike, Nishinomiya, Hyogo 663-8227, Japan, TEL: +81-798-32-2169, FAX: +81-798-34-7475, e-mail: takayuki.bougaki@ozeki.co.jp

Received August 9, 2016; Accepted November 8, 2016

We examined difference in productivity of α -EG by the fermentation method using non-glutinous rice and glutinous rice as starch materials. When non-glutinous rice was used as starch material, productivity of α -EG became 1.3 times higher in sake brewing method and 1.8 times higher in mirin (type of sweet sake used for cooking) brewing method compared with glutinous rice was used as starch materials. When α -EG was produced with maltose or isomaltose as sugar substrate, compared with isomaltose, productivity of α -EG of maltose became 1.2 times higher. It was thought that gelatinization of the starch of the materials rice and the action mechanism of the starch degrading enzymes influenced productivity of α -EG by the fermentation method.

Keywords: Ethyl α -D-glucoside, Non-glutinous rice, Glutinous rice, Maltose, Isomaltose

(責任編集委員：上野義栄)