

難消化性米が清酒製造へ及ぼす影響

伊藤俊彦¹，藤原淳一²，野口巧実¹，藤田直子²，橋爪克己¹¹ 秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科² 秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科

穀類を原料としたアルコール発酵では、初めに原料澱粉の糖化が必要となる。清酒においては米を原料とした米麴が用いられ、白米中の澱粉を糖化すると共にタンパク質や脂質なども分解し、清酒に独特の風味に寄与している。我々は米澱粉の生合成に関与する酵素遺伝子が欠損した変異体を多数保持しており、これら変異体米の醸造特性について調べることを目的とし製麴試験及び、小仕込み試験をした。原料米は変異体米3種類及び対照として親株である日本晴と酒造好適米である秋田酒こまちを用いた。また、製麴試験では変異体米による各種酵素活性への影響を確認した。その結果、以下のことを明らかにした。①掛米として用いた場合、変異体米系統は発酵速度が穏やかで、最終的な炭酸ガスの減量が少なく酒化率が低下した。②掛米及び麴米として用いた場合、変異体米系統は醗初期の発酵速度が早く、最終的な炭酸ガス減量は①と比較して増加し、得られた清酒の酒精度も高くなった。③麴米として用いた場合、変異体米系統は麴の各種酵素活性が高くなった。

キーワード：難消化性米， 麴酵素， 清酒醸造

清酒は高度に精白された白米を原料とし、麴による糖化と酵母による発酵によって造られる。清酒製造に適するとされる米は蒸きょうが容易で良い蒸米ができること、麴菌の破精込みが良いこと、溶解糖化が良いことなどがあげられる。酒造好適米は明治時代に近畿、中国地方の良質な酒造米として知られていた品種から経験的に選抜されてきた。酒造好適米に求められる性質は、当時とは異なり高度に精白された白米が使用される現在でも、基本的には変わらず、精米特性の良いこと、心白の形状が高精白に適していること、タンパクの含有量が低いこと、吸水性が良好であることなどがあげられる。現在では大粒で精米特性が良好、粗タンパクおよび粗脂肪が少ない酒造好適米品種が各地で開発され清酒製造に利用されている。更に清酒製造において原料米は製造コストの大半を占める。原料米の溶解率はすなわち原料の利用率であり、酒質にも大きな影響を与える。原料米の溶解は澱粉の分子構造と関係が深い。

我々は澱粉生合成関連酵素の各種アイソザイムを欠損したイネの変異体を有しており（藤田，2011），このイネが生産する米は澱粉生合成関連酵素欠損のために親株と比較し、デンプンの構造や組成，蛋白含有量に変化が生じている。これら変異体米の大きな特徴はアミロース含有量が多く，アミロペクチンの短鎖長の割合が減少し，長鎖長の割合が増加していることである（Asai *et al.*, 2014）。澱粉はグルコースが α -1,4結合し連なったアミロースと α -1,6側鎖の枝分かれ構造をもつアミロペクチンとで構成されており，アミロースは長い分子構造を有しているために隣り合う分子同士や脂質との再会合を起しやすく，老化しやすい。通常の粳米ではアミロースの含有量は20%程度なのに対して変異米は30~46%もの高い割合で含有している。

本研究ではこれら超高アミロース含有変異米の醸造特性解析を①掛米及び麴米に変異体米，②麴米のみに変異体米，③掛米のみに変異体米を使用した小

仕込み試験により行い、原料米が有する澱粉構造が清酒醸造に与える影響を明らかにするとともに、昨今の地球温高の進行とともに問題となっている高温登熟障害米による酒化率低下の解決策に繋がる基礎的知見を得ることを目的とした。

材料と方法

原料米

原料米に用いた品種は以下に示す 5 品種である。また、それぞれのアミロース含量及びアミロペクチン鎖長の特長を表 1 に示した。

日本晴：各澱粉生合成関連酵素欠損変異体の野生型親品種でジャポニカ米である。

秋田酒こまち：秋田県で品種改良された酒造好適米であり、玄米は大粒で外観品質に優れ、眼状の心白の発現が良好で、粗蛋白質含量が低い特徴を持つ。日本晴と同様ジャポニカ米に属する。

△SSIIIa 変異体米 (e1)：スターチシンターゼ (SS) IIIa 欠損変異体イネの胚乳種子。△SSIIIa 変異体米 (e1) はレトロトランスポゾンと化学的突然変異誘発によって作出された変異体である。グルコースの重合度 (DP) 30 以上の B₂ ~ B₄ のアミロペクチン側鎖が野生型と比較し 60 ~ 70%程度減少している。さらにアミロース含有量とアミロペクチンの DP500 以上の超長鎖 (extralong chains) が 1.4 ~ 1.7 倍に増加している。また、変異体米の澱粉顆粒は丸いものが多く存在する (Fujita *et al.*, 2007)。

表1 原料米のアミロース含有量とアミロペクチン鎖長の特長

原料米品種	アミロース含量 (%)	アミロペクチン
秋田酒こまち、日本晴	約20	
SSIIIa欠損変異体米 (e1)	30	DP \geq 33長鎖減少
SSIIIaおよびSSIVb欠損変異体米 (#2012、#2013)	33	同上
SSIIIaおよびBEIIb欠損変異体米 (#4019)	46	DP \leq 12短鎖激減

△SSIIIa/△SSIVb 変異体米 (#2012)：SSIIIa および IVb が欠損した澱粉生合成関連酵素二重欠損変異体イネの胚乳種子。この二重欠損変異体は SSIVb 欠損変異体と SSIIIa 欠損変異体米の交配後代により得ら

れた。この変異体米は白濁種子で、野生型のイネの澱粉粒が多角形であるのに対し澱粉粒の形態は球体を示す (藤田, 2013)。

△SSIIIa/△BEIIb 変異体米 (#4019)：SSIIIa と枝作り酵素 (BE) IIb を同時に欠損させた変異体イネの胚乳種子。この変異体米はアミロース含量 47%の超高アミロースの白濁種子である。アミロペクチンの構造は DP12 以下の短鎖が激減し、胚乳澱粉鎖長全体が長鎖長側にシフトしているという特徴を持つ (Asai *et al.*, 2014)。

麹菌及び酵母

麹菌には No.5 (*Aspergillus oryzae*:秋田今野商店) を使用した。酵母はきょうかい酵母 1801 を使用した。

製麴試験

製麴は恒温恒湿器 (espec) を用い、種切り後、31°C で 24 時間、手入れ後 38°C に維持して 20 時間後に出麴とした。

小仕込試験

小仕込試験は総米 200 g (同一品種での仕込のみ総米 100 g) の三段仕込、汲み水歩合は 140%とした。また、原料米による麴米及び掛米としての特性を検討するため、1, グルク吟 (アマノエンザイム) を用いた麴を用いない酵素仕込, 2, 麴を用いた仕込の 2 種類の小仕込試験をした。掛米は浸漬米吸水率を調製し、せいろを用いて 50 分蒸きょうした。仕込み温度は添え仕込み終了後 15°C で、1 日の踊り期間を設けた。仲仕込終了後 12°C に変更し、留仕込終了後 10°C で発酵を行った。炭酸ガス減量の推移は経時的に醪重量を電子天秤で測定し求めた。

麴の酵素活性測定

麴のグルコアミラーゼ活性および α -アミラーゼ活性は国税庁所定分析法に準じて測定し、ペプチダーゼ総合活性は高橋ら (2008) の方法を一部変更して測定した。すなわち、米グルテリン溶液 250 μ l と 0.1 M 乳酸緩衝液 (pH 4.0) 250 μ l をマイクロチューブに取り、攪拌後アルミブロック上で 40°C、5 分余熱し、その後酵素液 50 μ l 添加し、10 分間酵

素反応後、0.4 M TCA 500 μ l 加えて反応を停止した。次に 10,000 rpm, 10 分間遠心分離し、TCA 沈殿画分を取り除いた。酵素ブランクは米グルテリン溶液 250 μ l, 0.1 M 乳酸緩衝液 250 μ l に TCA 500 μ l 加えた後に酵素液 50 μ l 加え室温に静置して遠心分離し、沈殿画分を取り除いた。アルギニン標準物質及び遠心分離上澄みをマイクロプレートに 100 μ l とり、更にニンヒドリン試薬を 100 μ l 加え、80°C の恒温器で 20 分呈色反応した。室温まで冷ましてからマイクロプレートリーダー (TECAN) で 570 nm の吸光度を測定した。

生成酒の分析

生成酒のアルコール分はアルコメイト (理研計器) を用いて測定し、酸度及びアミノ酸度は国税庁所定分析法に従い滴定法で測定した。アミノ酸組成分析は L-8900 型アミノ酸分析計 (日立ハイテクノロジーズ) を用い、生体液分析法にて分析した。香気成分は 5975C GC/MSD (アジレント) を用いてヘッドスペース法で分析した。

結果及び考察

小仕込試験

1. 掛米の特性評価.

特性の異なる種々の原料米による掛米特性を検討するために、麴を用いず、酵素剤による仕込をした。掛米には秋田酒こまち、日本晴、e1、#2013、#4019 の 5 品種をそれぞれ、70% まで精米したものをを用いた。炭酸ガス減量を経時的に測定した結果を図 1 に示した。変異体米の親株である日本晴の発酵速度が最も早く、酒造好適米である秋田酒こまちが次いで早かった。変異体米を比較すると、#4019、#2013 e1 の順に発酵速度が遅延した。この結果から、アミロース含有量の多少が発酵速度に影響を及ぼし、更に #4019 の発酵速度が極端に遅いことからアミロペクチン鎖長の長短も発酵経過に大きく影響していることが示唆された。

2. 麴米の特性評価.

各原料米の麴米としての特性を評価するため、麴米に秋田酒こまち、日本晴、e1、#2013、#4019 の 5 品

種をそれぞれ、70% まで精米したものをを用い、各仕込共通の掛米に秋田酒こまち (70%) をを用いた。炭酸ガス減量を経時的に測定した結果を図 2 に示した。麴米として日本晴及び e1 をを用いた仕込では炭酸ガス減量に差は認められなかった。しかし、#2013 及び #4019 をを用いた仕込では醱初期における明らかな発酵速度上昇が認められた。この結果から、アミロース含有量が高い原料米を麴米とすることで、麴菌の酵素生産量の増加し、澱粉の消化が速くなっていることが示唆された。

3. 麴米及び掛米に同一品種を用いた小仕込.

掛米及び麴米に同一品種の原料米を用いた小仕込試験の発酵経過を図 3 に示した。麴米と掛米を同一品種にすることで、酵素仕込試験の際に認められた掛米品種のちがいによる発酵速度の差異が無くなり、変異体米を掛米に用いた仕込でも順調な発酵経過をたどった。この結果からアミロース含有量が多く消化性の悪い原料米を麴米に用いることで、難消化性澱粉を効率良く消化可能な麴が製麴可能となることが示唆された。

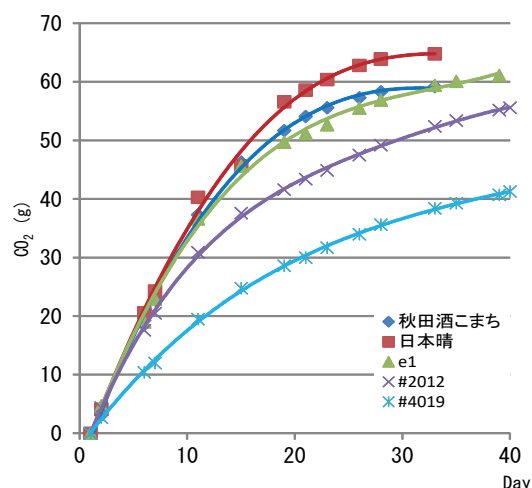


図 1 掛米品種の違いによる発酵経過の比較

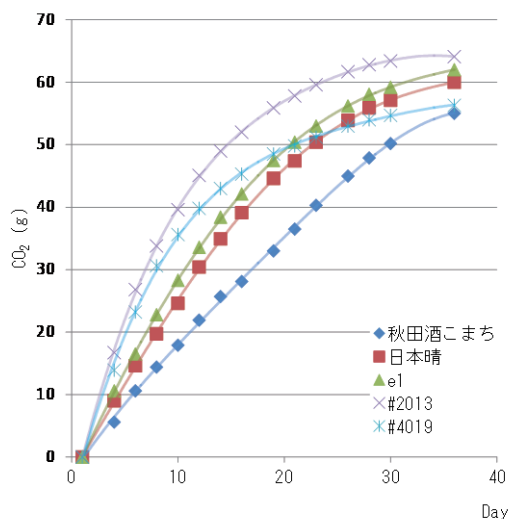


図2 掛米に秋田酒こまちを用いた発酵経過の比較

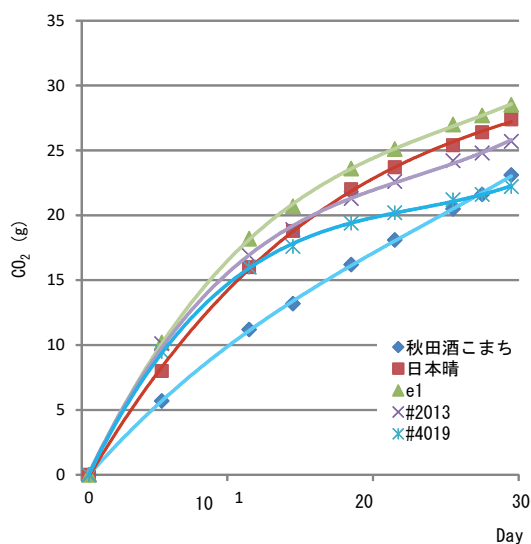


図3 麴米及び掛米に同一品種を用いた発酵経過の比較

麴の酵素活性

小仕込に用いた麴の酵素活性を比較すると、 α -アミラーゼ活性、グルコアミラーゼ活性及び総合ペプチダーゼ活性は酒造好適米品種である秋田酒こまちが最も低く、アミロース含有量が増えるほど活性が高くなる傾向が認められた(データ割愛)。この結果ら原料米のアミロース含有量が高く、難消化性の特長が強くなるほど麴菌は生育するためにより多くの各種酵素を生成したことが示唆された。

生成酒の分析

掛米の特性を評価した仕込1では最も生成酒量の多かった#2013に対し、#4019は約8割にとどまり、アルコール濃度は#2013の18.0%に対し14.1%にと

どまった。さらに米の溶けの指標となる総エキス量では約58%にとどまった。この結果より、アミロース含有量が特に多い#4019が強い難消化性を有していることが示唆された。ついで、麴米の特性評価をした仕込2では、e1の生成酒量が最も多かったが、品種間による大幅な差はなかった。これは、掛米に酒造好適米である秋田酒こまちを用いたため、全ての麴において順調に溶けが進んだものと考えられる。アルコール濃度および総エキスについても品種間による差は見られなかった。麴米及び掛米に同一品種を用いた仕込3ではe1の生成酒量が最大となり、#4019の生成酒量は#2013の約82%であったが、その他の品種とすると遜色ない結果であった。これらの結果から、#4019を麴米に用いることで難消化性澱粉を消化可能な麴が造れることが示唆された。

結論

アミロース含有量が高く、アミロペクチン側鎖が伸長した変異体米#4019は掛米に使用すると生成酒量が低くなりアルコール濃度も低くなった。一方、麴米として使用すると各種酵素活性が高くなり、高い難消化性を示す#4019の発酵経過を改善した。昨今問題となっている高温登熟障害米による酒化率(原料米から造れる清酒量)低下の主な原因はデンプンのアミロペクチン鎖長の伸長であると推察されている(奥田2012)。この酒化率の低下は酒造業経営に大きな影響を及ぼす。本研究の知見から難消化性を示す変異体米を用いた麴には難消化性澱粉を効率よく消化する能力が示された。この難消化性澱粉消化機構を解明し、応用することで高温登熟障害米の対策に寄与することが期待される。

文献

Asai, H., Abe, N., Mastusima, R., Crofts, N., Oitome, F., Nakamura, Y., and Fujita, N., (2014) Deficiencies in both starch synthase IIIa and branching enzyme IIb lead to a significant increase in amylose in SSIIainactive japonica rice seed. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 65, No. 18, p.

5497-5507

Fujita, Y., Yoshida, M., Konda, T., Saitou, K., Utsumi, Y., Tokunaga, Y., Nishi, A., Satoh, H., Park, J., Jane, J., Miyano, A., Hirochika, H., and Nakamura, Y. (2007) Characterization of SSIIIa-Deficient Mutants of Rice: The Function of SSIIIa and Pleiotropic Effects by SSIIIa Deficiency in the Rice Endosperm. *Plant Physiology*, Vol.114, No.4, p.2009-2023

高橋仁, 伊藤俊彦, 中沢伸重, 岩野君夫 (2006) .「米タンパク質を基質とした清酒麴のペプチダーゼ総合活性の測定法」『日本醸造協会誌』103(8), 638-645

藤田直子 (2013) 「澱粉変異体米の解析と利用」『化学と生物』 Vol.51, No.6, p.400-407

奥田将生 (2012) 「米のデンプン構造と醸造特性・気象条件との関係」『生物工程』 90, p.227-230

〔平成 29 年 6 月 30 日受付〕
〔平成 29 年 7 月 11 日受理〕

Effects of resistant starch containing rice on sake brewing.

Toshihiko Ito¹, Junichi Fujiwara², Takumi Noguchi¹, Naoko Fujita², Katsumi Hashizume¹

¹ Department of Biotechnology, Faculty of Bioresource, Akita Prefectural University

² Department of Biological Production, Faculty of Bioresource, Akita Prefectural University

The digestibility of rice is closely related to the decomposition of rice starch and alcohol fermentation. Therefore, the digestibility of rice is very important for the yield of alcohol. The digestibility of rice also affects enzyme production in *koji* making as well. We brewed Japanese sake using three varieties of mutant rice; these contain different length of amylopectin and a different ratio of amylose. We determined that the fermentation rate was dependent on amylopectin length and the amylose content of rice. When we used these mutant rice for the *koji*, high amylopectin length and amylose content of rice led to high enzyme activities. On the other hand, when we used these for *kakemai*, rice with high amylopectin lengths and amylose contents showed low alcohol yields.

Keywords: resistant starch, koji enzyme, brewing sake