麴酵素による蒸米消化反応によって生成するアミノ酸について

伊藤俊彦・熊谷久夫・高橋 仁*・佐藤 勉**・中沢伸重・岩野君夫
(秋田県立大学・秋田県総合食品研究所*・秋田今野商店**)

平成 20 年 7 月 3 日受理

Amino acid generation from steamed rice grains digested by a sake koji enzyme.

Toshihiko ITO, Hisao KUMAGAI, Hitoshi TAKAHASHI*, Tsutomu SATO**,
Nobushige NAKAZAWA and Kimio IWANO

(Faculty of Bioresource Science, Akita Prefectural University, Nakano Shimo Shinjyo, Akita 011-0195,

*Akita Research Institute of Food & Brewing, Araya-machi, Akita 010-1623,

**Akita Konno Co., Ltd., 248Kariwano, Daisen 019-2112)

A total of 275 combinations of digestion tests for steamed rice grains were conducted using five kinds of koji-rice varieties, five kinds of steamed-rice, and eleven strains of koji molds. We analyzed amino acid concentrations of digested solutions from the steamed rice with sake-koji. The obtained findings were as follows: 1). There was a significant correlation between total peptidase activity (TPase) and amino acid concentrations; 2). Concentrations of many amino acids had positive correlations with amounts of glutelin; 3). Concentrations of methionine and cystine in the digestion solution had a positive correlation with the amount of rice globulin and prolamin; 4). Amino acid concentrations related to sensory evaluations of sake were influenced by the varieties of steamed rice.

Key words: 麴菌株, 原料米品種, 蒸米溶解によるアミノ酸生成量

緒 論

筆者らは清酒の呈味に関係するアミノ酸を探索し、アラニン、グルタミン酸、アルギニン、アスパラギン酸の4つが呈味に関わっていることを明らかにした¹⁾。また、吟醸酒の官能評価に関係する化学成分を単相関分析で調べた結果から、i-ブタノール、チロソール、 β -フェニルエタノール、トリプトフォールが呈味に関わっていることを明らかにした²⁾。これらの化合物はそれぞれバリン、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファンを酵母が増殖の窒素源として資化し変換されて生成することが知られている³⁾。以上の知見から筆者らは清酒醸造におけるこれらのアミノ酸の生成に関与する要因を解明することは品質向上の観点から重要と考えて研究を行っている。過去において、家村

ら⁴⁾の蒸米消化で溶解する米タンパク質の原料米品種及び精米歩合による影響についての報告や、古川ら⁵⁾の清酒もろみにおける原料米タンパク質に関する報告等があるものの、原料米からのアミノ酸生成に関する知見は未だ理解が不十分である。筆者らは、清酒のアミノ酸の生成に関して、麴から持込まれるアミノ酸、蒸米タンパク質の酵素分解により生成するアミノ酸、酵母が資化・放出するアミノ酸の3つの要因に分けて研究を行っている。既に酵母が資化・放出するアミノ酸について、アラニンは酵母が放出するアミノ酸であること、アルギニン、グルタミン酸は麴からの持込み量が酵母の資化量を上回る麴があることを報告した⁶⁾。また前報⁷⁾において麴の残存アミノ酸量について調べた結果、アルギニンが全アミノ酸量の約18%も占めること、多くのアミノ酸は麴菌株と麴米品種の違いに

より約3倍の差があることを明らかにした。そこで今回、麴酵素による蒸米消化試験によって生成するアミノ酸について調べたところ興味ある結果を得たので報告する。

実験方法

(1) 実験材料

試料1) シャーレ法により製麹した麴を用いた実験には、平成18年度産の山田錦（精米歩合60%，兵庫県産）、五百万石（精米歩合55%，新潟県産）、美山錦（精米歩合60%，秋田県産）、春陽（精米歩合60%，秋田県産）、秋田酒こまち（精米歩合55%，秋田県産）の5種類を用いた。

試料2) 蓋麹で製麹した麴を用いた実験には、平成17年度産の山田錦（兵庫県産）、五百万石（新潟県産）、美山錦（秋田県産）、秋田酒こまち（秋田県産）、春陽（秋田県産）いずれも精米歩合60%を試料として用いた。全ての原料米は水分調整（水分10%）を行い白米水分の均一化を行った。

(2) 原料米のタンパク質組成

平成17年度産の試料2について前報⁹⁾のSDS-PAGEによる方法を一部変更し、以下に示した通り解析した。1,000粒重の平均値を1,000で除した値±3%以内の白米1粒を硫酸紙で包み、ペンチで破砕し、1.5ml容マイクロチューブに移した。その後タンパク質溶解液（SDS：4g，尿素：48g，グリセリン：20g，トリス：1.51g，2-メルカプトエタノール：4.5ml/100ml；pH 6.8）を700μl加えて一晩30°Cで静置した後ボルテックミキサーにて良く攪拌し、遠心分離（10,000×g，15min.）後得られた上澄みを試料としてSDS-PAGEにて分析した。SDS-PAGEはポリアクリルアミド濃度15%のゲルを用い、試料10μlを4レーンに、標準タンパク質として1μg及び5μgのBovine serum albumin (BSA) をそれぞれ1レーンづつ加えて泳動した。泳動後のゲルはCoomassie Brilliant Blue (CBB) で染色し、GS-800 (Bio-Rad社) でスキャンし、Quantity One (Bio-Rad社) を用いて解析した。白米の各タンパク質濃度はBSAを標準として求め4レーンの平均値で表した。解析結果は以上の操作を5回繰り返した平均値で示した。

(3) シャーレ法による製麹

麴菌は11菌株（秋田今野商店保有株，No.5菌，A

-27，AOK-2P，AOK-11，AOK-17，AOK-65，AOK-77，AOK-156，AOK-183，AOK-241，AOK-260），麴米5品種を用いて前報⁹⁾と同じ条件で製麹した。すなわち，蒸米を95°Cで15時間熱風乾燥してα米とし，α米10gに分生胞子を 1.0×10^5 /mlの濃度で懸濁した滅菌水5mlを加えて種麹散布とした。攪拌した後で表面をろ紙で覆い，湿度を6.5% NaOH溶液で95%に調整したステンレス製バットにシャーレ15枚を平面に並べて入れ，このバットを温度35°Cの恒温器に入れて製麹した。24時間後に1回手入れし43時間後に出麹とした。製麹は1菌株について3枚のシャーレで行い出麹後合併し分析に供した。

(4) 蓋麹法による製麹

精米歩合60%の山田錦，美山錦，吟の精，秋田酒こまち，春陽の5品種（平成17年産）を原料米として1品種当たり3枚の麴蓋を使い蓋麹法（1.5kg）で種麹散布量50g/100kg，盛33°C，仲仕事35°C，仕舞仕事38°C，出麹40°Cとして製麹した。なお，この際使用した麴菌は全てNo.5株を用いた。

(5) 酵素抽出液の作成

国税庁所定分析法に基づき以下のようにスケールダウンして麴酵素を抽出した。清酒麴5gをとり，麴抽出液25mlを加えて室温で3時間抽出した。No.5Aのろ紙でろ過して，ろ液20mlを透析チューブにいれ，20mM酢酸緩衝液（pH 4.0）で一夜透析した。その後，40mlに定容して清酒麴の酵素抽出液とし，50mlチューブで凍結保存した。

(6) 酵素活性

α-アミラーゼ（AAase），グルコアミラーゼ（GAase），酸性プロテアーゼ（APase），酸性カルボキシペプチダーゼ（ACPease）は国税庁所定分析法に従って測定した。総合ペプチダーゼ（TPase）は筆者らが設定した前報⁹⁾の測定法を用いて測定した。つまり，米グルテリンを基質として40°C，60分間で1mgのアルギニンを生成する活性を1単位として求めた。

(7) 蒸米消化試験

白米2g相当の蒸米を50ml容チューブにとり，(5)で麴から抽出した酵素液を5ml，0.1M乳酸緩衝液（pH 4.0）を500μl，蒸留水500μlを加えて攪拌後，防腐剤としてトルエン0.1ml添加した。この反応条件は麴歩合20%，汲水歩合300%に相当する。反応条件は15°C，6日間とし，反応後に遠心分離（8000

rpm, 15 min) してその上清を解析に用いた。

(8) アミノ酸分析

日立 L-8800 アミノ酸分析計を用いた。分析用バイアルに消化液を 100 μ l, 0.02 N-HCl を 900 μ l 加えて混合し, アミノ酸分析計にセットし, 生体液分析法で測定した。

(9) 統計解析

相関分析はマイクロソフトエクセル付属の分析ツールを用いた。判別分析は多変量解析ハンドブック¹⁰⁾ 付属の解析ソフトを用いて行った。

実験結果及び考察

(1) 蒸米消化液のアミノ酸組成

清酒の醪を想定して反応 pH は 4.0, 反応温度は 15°C, 酵素活性は麴歩合 20% 相当, 反応日数 6 日間の条件で蒸米消化試験を行った。反応系は白米 2 g 相当の蒸米と小さいため汲水歩合を 300% と実際の醪よりも多くして蒸米溶解液量を増やした。この条件でシャーレ法にて製麴した 55 種類の麴酵素液 (麴菌 11 菌株, 麴米 5 種) を用いて, 蒸米 (5 種) の消化反応を行って得られた 275 個のデータを解析した。第 1 表に使用した麴の α -アミラーゼ活性, グルコアミラーゼ活性, 酸性ペプチダーゼ活性, 酸性カルボキシペプチダーゼ活性, 総合ペプチダーゼ活性を麴米 5 種の平均値, 最大値, 最小値を麴菌株毎に示した。また第 2 表には蒸米消化液のブリックス値のデータ範囲と変動率を麴菌, 蒸米, 麴米毎に示した。第 1 表から明らかなように菌株間での酵素活性データ範囲及び, 5 品種の麴米間での酵素活性データ範囲は共に広がった。このことから酵素活性には麴菌株及び麴米共に大きな影響を与えることが示された。また, 第 2 表のブリックス値の変動率から, 蒸米を固定した際の変動率が小さいことが示された。このことから麴菌株と麴米の組合せが蒸米の糖化にも大きく影響していることが示された。また, グルコースとアミノ酸の濃度は大きな変動を示し, 蒸米タンパク質分解とデンプン分解に正の相関関係が認められた (データ省略)。これは今回行った蒸米消化試験が 15°C, 6 日間という条件が醪初期に相当すると考えられ, 家村ら⁴⁾の蒸米のタンパク質分解とデンプンの溶解とは特に溶解初期において互に正の相関があるという報告に一致した。この結果から醪初期におけるプロテアーゼ, ペプチダーゼのタンパ

Table 1 Enzyme activity of sake-koji made by a laboratory dish method.

	AAase (U/g-koji)			GAase (U/g-koji)			APase (U/g-koji)			ACPase (U/g-koji)			TPase (U/g-koji)		
	Ave.	Max.	Min.	Ave.	Max.	Min.	Ave.	Max.	Min.	Ave.	Max.	Min.	Ave.	Max.	Min.
AOK-2 P	477.0	798.0	171.0	334.4	401.0	181.0	5135.6	7616.0	3798.0	7023.4	9154.0	4792.0	20.9	24.5	19.7
AOK-11	719.0	895.0	193.0	252.2	302.0	169.0	5864.0	6868.0	4745.0	6490.0	7756.0	5195.0	22.5	27.2	18.4
AOK-17	759.0	1154.0	225.0	237.6	279.0	163.0	5042.2	6607.0	4425.0	6576.8	7387.0	5379.0	16.8	20.8	14.2
AOK-65	753.2	1075.0	241.0	268.0	279.0	201.0	5166.0	7991.0	4185.0	6275.8	6741.0	5008.0	21.0	27.5	14.2
AOK-77	698.6	941.0	274.0	237.6	279.0	172.0	4464.0	6345.0	3763.0	5625.0	6187.0	4463.0	18.8	28.8	12.5
AOK-156	710.6	1082.0	225.0	262.2	295.0	203.0	5165.0	7668.0	4155.0	6399.6	7977.0	5205.0	17.5	21.6	12.7
AOK-183	509.8	678.0	380.0	275.0	319.0	209.0	3484.0	4110.0	2987.0	3266.8	4952.0	2034.0	10.6	13.8	7.5
AOK-241	754.6	1127.0	252.0	262.2	300.0	207.0	5286.8	8162.0	4200.0	5932.8	6494.0	4846.0	19.9	27.5	14.2
AOK-260	383.4	504.0	294.0	259.2	288.0	241.0	4572.4	5180.0	3944.0	5879.6	7046.0	4406.0	15.9	17.2	12.4
AOK-A-27	658.8	940.0	234.0	246.0	274.0	199.0	4739.8	7347.0	3516.0	5412.2	7337.0	3904.0	13.8	19.4	13.5
No. 5	451.0	680.0	271.0	149.4	179.0	115.0	3732.2	4708.0	3233.0	5291.6	6926.0	3898.0	11.3	13.8	8.2

AAase : α -amylase, GAase : glucoamylase, APase : acid protease, ACPase : acid carboxy peptidase, TPase : total peptidase

Table 2 Range of Brix in the digestion of steamed rice.

Strains of koji	Average(%)	Maximum(%)	Minimum(%)	Standard deviation	CV(%)
AOK-2 P	17.2	20.0	13.0	1.8	10.2
AOK-11	17.5	20.2	14.1	1.6	9.3
AOK-17	17.4	19.8	13.9	1.6	9.3
AOK-65	17.6	20.0	14.2	1.6	8.9
AOK-77	17.4	19.6	14.3	1.5	8.7
AOK-156	17.4	19.4	14.2	1.5	8.4
AOK-183	16.4	19.2	12.2	2.0	11.9
AOK-241	17.5	20.2	14.6	1.5	8.3
AOK-260	17.4	19.8	14.5	1.5	8.4
AOK-A 27	17.4	20.1	14.3	1.6	9.2
No. 5	16.5	19.3	13.9	1.6	9.6
Kind of steamed rice					
Yamadanishiki	18.0	19.4	15.4	1.0	5.6
Gohyakumangoku	16.8	18.3	14.3	0.8	4.8
Miyamanishiki	14.9	16.3	12.2	0.8	5.6
Syunyoun	17.4	18.5	15.2	0.7	4.3
Akitasakekomachi	19.2	20.2	17.6	0.6	2.9
Kind of koji rice					
Yamadanishiki	17.1	20.2	12.2	1.8	10.5
Gohyakumangoku	17.7	19.4	14.5	1.2	7.0
Miyamanishiki	17.6	19.8	14.2	1.5	8.2
Syunyoun	16.7	20.1	13.0	1.7	10.3
Akitasakekomachi	17.1	20.2	12.9	1.7	9.9

Strains of koji ; n=11, Kind of steamed rice ; n=5, Kind of koji rice ; n=5

ク質分解はアミラーゼ，グルコアミラーゼによるデンプン分解からなる米の溶解に影響を受けていることが考えられた。

蒸米消化液のアミノ酸濃度を呈味性アミノ酸であるアラニン，グルタミン酸，アルギニン，アスパラギン酸¹⁾ また，エーリッヒ経路にて芳香族アルコールに変換されるチロシン，フェニルアラニン，トリプトファン²⁾，フーゼルアルコールに変換されるバリン³⁾ について抜粋して第3表に示した。各アミノ酸の中ではアルギニンが圧倒的に多く全体の約19%も占めていた。アルギニンは前報⁷⁾ で麴の残存アミノ酸としても多量に存在していることを報告した。アルギニンは苦味を呈するアミノ酸であることから生成を低減することは清酒の品質向上の観点から重要であると考えられるが，今回の実験から最大値425ppm（美山錦），最小値144ppm（春陽）と麴菌，麴米の組合せの違いで大きな差異が生じた。最小値を示した蒸米は低グルテリン米の春陽であるが，他の蒸米の最小値と比較しても大

きな違いが認められず，蒸米の違いを無視しても麴菌株，麴米によるアルギニン生成量が大きく異なることが示された。このことは，前報¹¹⁾ において麴中のアルギニン量が麴米品種により差異が有ることを報告した結果と一致した。

(2) 麴の酵素活性と蒸米消化液のアミノ酸生成量との相関

蒸米消化液中的アミノ酸生成量と麴のタンパク質分解酵素活性との相関を調べた。まず蒸米品種によりタンパク質組成が異なり麴酵素による分解も差異があることが予想されたため，相関分析は蒸米品種ごとに行なった。従ってデータは麴米5種，麴菌株11株の計55種類の麴酵素液による蒸米消化試験データを用いた。第4表に酸性プロテアーゼ（APase），第5表に酸性カルボキシペプチダーゼ（ACPase），第6表に総合ペプチダーゼ（TPase）の結果を示した。ACPaseは全ての酵素液について有意な相関関係が認められず前報⁹⁾ において5品種の麴（山田錦，美山錦，秋田酒こ

Table 3 Amino acid concentrations in the digestion of steamed rice. (n=55)

	Steamed rice	Ala	Glu	Arg	Asp	Tyr	Phe	Trp	Val	Total Amino acid
Yamadanishiki	Ave. (ppm)	79	106	311	61	107	85	9	63	1699
	Max. (ppm)	102	134	385	78	136	108	14	90	2134
	Min. (ppm)	30	44	148	25	38	30	2	23	655
	C. V. (%)	19.9	18.9	15.7	18.5	19.9	20.5	30.8	21.5	17.8
Gohyakumangoku	Ave. (ppm)	87	102	307	72	116	94	9	69	1803
	Max. (ppm)	111	133	394	96	154	123	14	90	2320
	Min. (ppm)	34	39	151	23	44	35	2	26	704
	C. V. (%)	19.7	20.3	16.6	19.9	19.7	20.2	32.1	20.6	18.0
Miyamanishiki	Ave. (ppm)	82	94	339	56	109	87	8	67	1775
	Max. (ppm)	108	123	425	72	147	115	13	91	2286
	Min. (ppm)	31	33	151	20	38	29	1	23	626
	C. V. (%)	20.5	20.9	16.8	20.1	20.8	21.3	34.5	21.8	18.6
Syunyou	Ave. (ppm)	64	90	271	59	82	64	9	52	1385
	Max. (ppm)	81	119	343	73	110	86	16	72	1797
	Min. (ppm)	28	36	144	25	31	23	1	21	560
	C. V. (%)	18.7	19.9	14.7	17.8	21.0	21.7	33.5	20.6	17.4
Akitasakekomachi	Ave. (ppm)	84	114	328	61	105	81	7	67	1670
	Max. (ppm)	105	145	378	76	131	105	13	86	2062
	Min. (ppm)	37	48	198	24	47	33	1	34	760
	C. V. (%)	18.6	19.1	11.8	18.9	18.3	19.7	38.8	18.2	16.2

Table 4 Correlation coefficient between the amino acid concentration in the digestion of steamed rice and acid protease activity of the rice koji. (n=55)

Amino acid	Yamadanishiki	Gohyakumangoku	Miyamanishiki	Syunyou	Akitasakekomachi
Alanine	0.375 **	0.251 —	0.305 *	0.347 ***	0.447 ***
Glutamic acid	0.389 **	0.356 **	0.368 **	0.230 —	0.498 ***
Arginine	0.278 *	0.091 —	0.268 *	0.166 —	0.470 ***
Leucine	0.450 ***	0.321 **	0.366 **	0.224 —	0.537 ***
Proline	0.324 *	0.187 —	0.300 *	0.214 —	0.257 —
Valine	0.464 ***	0.342 **	0.410 **	0.418 **	0.454 ***
Tyrosine	0.358 **	0.243 —	0.278 *	0.219 —	0.472 ***
Glycine	0.420 **	0.299 *	0.383 **	0.410 **	0.431 ***
Phenylalanine	0.389 **	0.287 *	0.345 **	0.194 —	0.411 **
Isoleucine	0.423 ***	0.282 *	0.350 **	0.277 *	0.463 ***
Lysine	0.267 *	0.121 —	0.274 *	0.223 —	0.379 **
Glutamine	-0.003 —	0.040 —	0.239 *	0.222 —	0.239 —
Serine	0.358 **	0.269 *	0.314 *	0.303 *	0.395 **
Asparagine	0.445 ***	0.363 **	0.444 ***	0.319 *	0.384 **
Histidine	0.453 ***	0.260 —	0.430 ***	0.482 ***	0.534 ***
Aspartic acid	0.430 ***	0.343 **	0.350 **	0.316 *	0.443 ***
Threonine	0.425 ***	0.281 *	0.332 *	0.380 **	0.375 **
Cystine	0.337 *	0.241 —	0.211 —	0.251 —	0.123 —
Tryptophan	0.487 ***	0.467 ***	0.486 ***	0.612 ***	0.504 ***
Methionine	0.390 **	0.305 *	0.311 *	0.281 *	0.449 ***
Total amino acid	0.335 *	0.229 —	0.323 *	0.268 *	0.431 ***

*** ; 0.1 % level of significance $r(53, 0.001) = 0.422$ ** ; 1 % level of significance $r(53, 0.01) = 0.338$ * ; 5 % level of significance $r(53, 0.05) = 0.262$

— ; not significant

Table 5 Correlation coefficient between the amino acid concentration in the digestion of steamed rice and acid carboxypeptidase activity of the rice koji. (n=55)

Amino acid	Yamadanishiki	Gohyakumangoku	Miyamanishiki	Syunyou	Akitasakekomachi
Alanine	0.036 —	0.033 —	0.012 —	0.068 —	-0.022 —
Glutamic acid	0.046 —	0.025 —	0.007 —	0.105 —	0.008 —
Arginine	0.101 —	0.075 —	0.025 —	0.121 —	0.036 —
Leucine	0.041 —	0.036 —	0.021 —	0.123 —	-0.022 —
Proline	0.010 —	0.043 —	0.030 —	0.054 —	0.161 —
Valine	-0.063 —	-0.024 —	0.007 —	-0.006 —	-0.029 —
Tyrosine	0.097 —	0.075 —	0.053 —	0.125 —	-0.001 —
Glycine	-0.009 —	0.013 —	-0.009 —	0.036 —	-0.084 —
Phenylalanine	0.052 —	0.037 —	0.027 —	0.108 —	-0.002 —
Isoleucine	0.034 —	0.038 —	0.019 —	0.091 —	0.015 —
Lysine	0.118 —	0.095 —	0.063 —	0.126 —	0.080 —
Glutamine	0.173 —	0.135 —	0.114 —	0.149 —	0.122 —
Serine	0.003 —	0.006 —	-0.019 —	0.088 —	0.000 —
Asparagine	-0.046 —	-0.037 —	-0.032 —	0.071 —	0.016 —
Histidine	-0.015 —	0.002 —	-0.045 —	0.003 —	0.001 —
Aspartic acid	0.048 —	0.047 —	0.035 —	0.081 —	0.034 —
Threonine	0.019 —	0.023 —	-0.002 —	0.068 —	0.043 —
Cystine	0.127 —	0.140 —	0.151 —	0.175 —	0.109 —
Tryptophan	-0.043 —	-0.056 —	-0.071 —	-0.039 —	-0.206 —
Methionine	0.088 —	0.073 —	0.065 —	0.134 —	0.052 —
Total amino acid	0.064 —	0.054 —	0.033 —	0.102 —	0.026 —

— ; not significant

Table 6 Correlation coefficient between the amino acid concentration in the digestion of steamed rice and total peptidase activity of the rice koji. (n=55)

Amino acid	Yamadanishiki	Gohyakumangoku	Miyamanishiki	Syunyou	Akitasakekomachi
Alanine	0.477 ***	0.517 ***	0.516 ***	0.580 ***	0.567 ***
Glutamic acid	0.515 ***	0.581 ***	0.549 ***	0.572 ***	0.633 ***
Arginine	0.439 ***	0.458 ***	0.461 ***	0.482 ***	0.563 ***
Leucine	0.563 ***	0.586 ***	0.585 ***	0.577 ***	0.631 ***
Proline	0.440 ***	0.496 ***	0.508 ***	0.488 ***	0.562 ***
Valine	0.504 ***	0.558 ***	0.522 ***	0.586 ***	0.627 ***
Tyrosine	0.517 ***	0.547 ***	0.530 ***	0.563 ***	0.621 ***
Glycine	0.459 ***	0.516 ***	0.532 ***	0.548 ***	0.565 ***
Phenylalanine	0.518 ***	0.551 ***	0.548 ***	0.572 ***	0.613 ***
Isoleucine	0.505 ***	0.534 ***	0.534 ***	0.583 ***	0.604 ***
Lysine	0.468 ***	0.484 ***	0.495 ***	0.548 ***	0.554 ***
Glutamine	0.338 **	0.405 **	0.450 ***	0.481 ***	0.509 ***
Serine	0.427 ***	0.485 ***	0.485 ***	0.549 ***	0.557 ***
Asparagine	0.498 ***	0.567 ***	0.561 ***	0.573 ***	0.584 ***
Histidine	0.520 ***	0.542 ***	0.551 ***	0.644 ***	0.642 ***
Aspartic acid	0.488 ***	0.560 ***	0.530 ***	0.590 ***	0.595 ***
Threonine	0.505 ***	0.513 ***	0.527 ***	0.575 ***	0.558 ***
Cystine	0.493 ***	0.549 ***	0.538 ***	0.558 ***	0.480 ***
Tryptophan	0.608 ***	0.635 ***	0.684 ***	0.621 ***	0.615 ***
Methionine	0.553 ***	0.579 ***	0.571 ***	0.584 ***	0.629 ***
Total amino acid	0.485 ***	0.525 ***	0.523 ***	0.562 ***	0.599 ***

*** ; 0.1 % level of significance $r(53, 0.001) = 0.422$ ** ; 1 % level of significance $r(53, 0.01) = 0.422$

まち、吟の精、春陽)を用いた蒸米消化試験において ACPase と蒸米消化において生成量が最も多い Arg 生成量が無相関だった結果と一致した。また、これらの結果は布川ら¹²⁾の清酒のアミノ酸生成とカルボキシペプチダーゼ活性に正の相関があるという報告に相反する結果であった。総合ペプチダーゼは前報⁹⁾の結果と一致し全酵素液とも最も高い相関関係が認められた。総合ペプチダーゼは米グルテリンを基質とした活性であることから蒸米タンパク質の分解に関わる多くの酵素の総合された活性を表すため高い相関が認められたものと考えられる。一方酸性カルボキシペプチダーゼは合成ペプチド (Cbz-Glu-Tyr) を基質とした活性であり麹菌が生産した一部の活性のみを表しているため麹菌、麴米、蒸米を同一品種とした際には酵素活性と生成アミノ酸量との間に高い相関が認められる⁹⁾が、今回のように多種類の麹菌、麴米、蒸米を使

った組合せ実験では相関が低くなったものと考えられた。酸性プロテアーゼはミルクカゼインを基質とした活性であるが、第4表に示したように総合ペプチダーゼよりも相関が低く、蒸米によっては相関が認められないものも見受けられた。以上の結果から筆者らが構築した総合ペプチダーゼ活性が麹酵素による蒸米からのアミノ酸生成を反映する有効な指標となることが裏づけられた。

(3) アミノ酸生成に及ぼす麹菌、麴米、蒸米の違いの影響

筆者らが呈味に関係すると考えている8種類のアミノ酸(アラニン、グルタミン酸、アルギニン、アスパラギン酸、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、バリン)の生成量に対して麹菌、麴米、蒸米の違いの3要因がどの程度影響するか表1,2で示したデータについて分散分析を実施した。その結果、8種類

Table 7 Differences in amino acid concentration in the digestion of steamed rice among *Aspergillus oryzae* strains, varieties of koji rice, and varieties of steamed rice.

	Strains (n=11)			Varieties of koji rice (n=5)			Varieties of steamed rice (n=5)		
	Max. (ppm)	Min. (ppm)	C. V. (%)	Max. (ppm)	Min. (ppm)	C. V. (%)	Max. (ppm)	Min. (ppm)	C. V. (%)
Alanine	90	47	26.3	86	70	32.8	87	64	32.8
Glutamic acid	113	60	26.3	110	91	32.7	114	90	32.7
Arginine	346	220	26.3	336	288	32.7	339	271	32.7
Leucine	163	86	26.4	158	129	32.7	157	125	32.7
Proline	73	32	26.4	67	53	32.7	71	49	32.8
Valine	74	39	26.3	70	56	32.7	69	52	32.8
Tyrosine	117	62	26.3	113	93	32.7	116	82	32.8
Glycine	56	24	26.3	54	42	32.7	55	40	32.7
Phenylalanine	93	48	26.3	90	73	32.7	94	64	32.8
Isoleucine	60	30	26.3	57	47	32.7	60	40	32.8
Lysine	134	80	26.3	130	110	32.7	131	99	32.7
Glutamine	215	107	26.4	211	171	33.0	227	124	33.1
Serine	71	33	26.4	67	54	32.7	70	51	32.7
Asparagine	75	33	26.4	71	56	32.7	72	45	32.9
Histidine	38	19	26.3	37	30	32.7	37	27	32.7
Aspartic acid	65	36	26.3	64	53	32.7	61	56	32.7
Threonine	36	16	26.3	34	27	32.7	35	27	32.8
Cystine	14	4	26.8	13	10	32.7	15	5	33.2
Tryptophan	10	3	26.8	11	7	32.8	9	7	32.8
Methionine	48	25	26.4	47	39	32.7	47	39	32.7
Total	1,866	1,004	26.3	1,818	1,498	32.7	1,803	1,386	32.8

Table 8 Total peptidase activity and total amino acid concentrations.

Strains	TPase(U/g・koji)	Aamino acid(ppm)
AOK-2 P	22.8 U/g・koji	1,866 ppm
AOK-11	23.9	1,717
AOK-17	17.8	1,791
AOK-65	22.5	1,782
AOK-77	20.4	1,649
AOK-156	18.6	1,755
AOK-183	11.3	1,004
AOK-241	21.3	1,801
AOK-260	16.9	1,829
AOK-A-27	15.0	1,560
No. 5	12.6	1,573

Values are the means of 5 cultivars.

のアミノ酸全てに対して麴菌、麴米、蒸米の3要因が危険率0.1%で有意な影響が認められた（データ省略）。また交互作用も認められ特に麴菌と麴米の交互作用が大きいたことが判明した（データ省略）。麴菌、麴米、蒸米の3要因に分けて各アミノ酸生成量の最大値と最小値を比べた結果を第7表に、第8表に麴菌11株の原料米5種における総合ペプチダーゼ活性の平均値及びアミノ酸生成量の平均値を示した。第7表に示したように麴菌株の違い及び原料米品種の違い、共に大きな変動率を示した。また、第8表に示したように総合ペプチダーゼ活性は菌株間で2.1倍、全アミノ酸生成量は約2倍の差があった。また、第1表から総合ペプチダーゼ活性が高い株は α -アミラーゼ活性及び酸性プロテアーゼ活性が高くなる傾向が認められる。このことは前報¹⁴⁾で示した総合ペプチダーゼ活

性とは α -アミラーゼ活性及び酸性プロテアーゼ活性には比較的高い相関が得られた結果と一致した。これらの結果より麴菌、麴米、蒸米の組合せがアミノ酸生成及び蒸米の溶解に大きな影響を与え、麴米に適した麴菌の選択がアミノ酸生成の制御には重要であると考えられた。

(4) 白米のタンパク質組成と蒸米消化液のアミノ酸組成との相関分析

白米の胚乳貯蔵タンパク質のうち、麴酵素により消化されやすいグルテリンが約60%を占める¹⁴⁾。また、第6表に示したように麴酵素による蒸米溶解反応によって生成するアミノ酸と米グルテリンタンパク質を基質とした総合ペプチダーゼ活性との間に正の有意な相関関係が認められた。以上のことから、蒸米消化により生成するアミノ酸は白米のグルテリンが分解されて生成する量が多いと推論された。その確認のために白米タンパク質組成と蒸米消化液のアミノ酸生成量との関係について検討するために麴米と蒸米を同一品種（精米歩合60%の山田錦、吟の精、美山錦、春陽、秋田酒こまちの5品種（平成17年産））の組合せとした蒸米消化試験を行った。麴は蓋麴法により製麴したものを使用した。麴米は5品種用い、1品種について3枚の麴を造り、合計15の麴酵素液を得た。蒸米消化試験は蒸米5品種、15の麴酵素液を用いて行い、合計75組のデータを得た。統計解析は、同一品種由来の麴酵素液データを平均して用いた。つまり5品種のアミノ酸データを用いて行った。第9表には白米タンパク質組成及び酸性カルボキシペプチダーゼ活性、総合ペプチダーゼ活性を示し、タンパク質組成とアミノ酸組成の相関分析結果を第10表に示した。

Table 9 Protein compositions of rice and enzyme activities.

		Yamadanishiki	Ginnosei	Miyamanishiki	Syunyou	Akita sakekomachi
Protein compositions (mg/g-rice)	GluA	9.17	9.47	9.11	2.30	8.47
	Glo	3.07	3.23	3.12	3.80	2.97
	GluB	7.08	6.24	7.37	1.20	6.24
	16 kpro	2.62	2.72	2.60	3.63	3.10
	13 kpro	3.25	3.21	3.95	4.28	3.25
	10 kpro	2.15	3.11	2.12	3.25	2.65
Enzyme activities (U/g-koji)	ACPase	4195	7360	5005	4404	7323
	TPase	10.3	9.5	12.8	15.9	13.6

GluA : glutelin acidic subunit, Glo : globulin, GluB : glutelin basic subunit

16 Kpro : 16 kDa prolamin, 13 kPro : 13 kDa prolamin, 10 kDa : 10 kDa prolamin

Table 10 Correlation coefficient between the rice protein components and amino acid components in the digestion of steamed rice. (n=5)

	GluA	Glo	GluB	16 kpro	13 kpro	10 kpro	Total
Aspartic acid	0.057	0.150	0.048	0.194	0.096	0.101	0.212
Threonine	0.821*	-0.552	0.820*	-0.471	-0.610	0.325	0.658
Serine	0.937***	-0.748*	0.934***	-0.662	-0.811*	0.373	0.649
Asparagine	0.940***	-0.752*	0.936***	-0.666	-0.810*	0.346	0.650
Glutamic acid	0.780*	-0.504	0.774*	-0.415	-0.571	0.302	0.644
Glutamine	0.950***	-0.767*	0.945***	-0.678*	-0.832**	0.367	0.651
Glycine	0.860**	-0.667	0.854**	-0.581	-0.733*	0.342	0.610
Alanine	0.861**	-0.669*	0.856**	-0.584	-0.729*	0.325	0.614
Valine	0.834**	-0.618	0.828*	-0.531	-0.684*	0.326	0.620
Cystine	-0.583	0.411	-0.588	0.367	0.478	-0.418	-0.442
Methionine	-0.060	0.315	-0.077	0.428	0.275	-0.095	0.201
Isoleucine	0.850**	-0.744*	0.843**	-0.663	-0.804*	0.326	0.534
Leucine	0.820*	-0.660	0.812*	-0.575	-0.712*	0.255	0.567
Tyrosine	0.904**	-0.693*	0.898**	-0.603	-0.758*	0.349	0.651
Phenylalanine	0.853**	-0.701*	0.850**	-0.626	-0.743*	0.278	0.575
Histidine	0.593	-0.449	0.598	-0.409	-0.461	0.166	0.430
Lysine	0.750*	-0.624	0.750*	-0.563	-0.641	0.171	0.501
Arginine	0.850**	-0.702	0.837**	-0.607	-0.776*	0.331	0.571
Proline	0.698*	-0.511	0.685*	-0.422	-0.567	0.192	0.530

*** ; 0.1 % level of significance $r(3, 0.001) = 0.934$ ** ; 1 % level of significance $r(3, 0.01) = 0.832$ * ; 5 % level of significance $r(3, 0.05) = 0.669$

第9表から、酸性カルボキシペプチダーゼ活性とグルテリン含量を比較するとグルテリン含量と酸性カルボキシペプチダーゼ活性の間には関連が認められなかった ($r=0.117$)。しかし、グルテリン含量の多い山田錦や吟の精は総合ペプチダーゼ活性が弱く、春陽のようにグルテリン含量が少ないと総合ペプチダーゼ活性が強くなる事が示された ($r=0.718$)。例外として秋田酒こまちの総合ペプチダーゼ活性は春陽の活性と同等に高くなった。筆者らは現在蒸米品種によるタンパク質消化の差異を検討しており、秋田酒こまちのタンパク質が他品種と比較し溶けにくい性質であることを見出している。このことが本研究において秋田酒こまちの総合ペプチダーゼ活性が高くなった要因と考え、現在検討中である。また、筆者らは前報において製麴における麴菌のタンパク質分解酵素の生産を調べ、麴米のグルテリン含有量と総合ペプチダーゼ活性との間に負の高い有意な相関関係が認められたこと¹³⁾を報告したが、今回の結果においても同様の傾向が認められた。

第10表に示したように大部分のアミノ酸はグルテリン酸性サブユニット及びグルテリン塩基性サブユニットと高い正の相関が認められた。この結果は大部分のアミノ酸はグルテリンからの由来が多いことを示すものであった。以上の結果から、グルテリンは麴菌にとって分解し易いタンパク質のためグルテリンの多い麴米では麴菌がグルテリン分解酵素を多量に生産する必要がないため、総合ペプチダーゼ活性が減少し、更にグルテリン含量と多くのアミノ酸との間に高い相関が認められたことから、原料米を選択することで清酒中のアミノ酸量を制御できる可能性が示唆された。

要 約

麴酵素による蒸米の溶解によって生成するアミノ酸について調べたところ以下の興味ある結果が得られた。

1. アミノ酸生成量は総合ペプチダーゼ活性と高い正の相関が認められ、従来の酸性カルボキシペプチダーゼ活性は全く相関が認められず、酸性プロテアーゼ活性は相関が低かった。

- 2, 大部分のアミノ酸生成量は原料米のグルテリン含有量と正の相関が認められたが, 含硫アミノ酸のメチオニン, シスチンはグロブリンとプロラミンと正の相関が認められた。
- 3, 呈味に関係するアミノ酸生成量は麴菌, 麴米品種, 蒸米品種の3要因の影響が認められたが特に蒸米品種の影響が大きかった。

文 献

- 1) 岩野君夫, 高橋和弘, 伊藤俊彦, 中沢伸重; 醸協, 99(9), 659-664 (2004)
- 2) 伊藤俊彦, 小松幸恵, 高堂斐, 高橋仁, 田母神繁, 小泉武夫, 中沢伸重, 岩野君夫; 醸協, 103(7), 562-569 (2008)
- 3) 醸造物の成分; (財)日本醸造協会, 東京 (平成11年)
- 4) 家村芳次, 太田ゆかり, 原昌道; 醸協, 90(12), 947-952 (1995)
- 5) 古川幸子, 水間智哉, 柳内敏晴, 清川良文, 若

- 井芳則; 醸協, 95(4), 295-303 (2000)
- 6) 伊藤俊彦, 渡辺沙織, 渡辺誠衛, 中沢伸重, 岩野君夫; 醸協, 101(11), 879-885 (2006)
- 7) 伊藤俊彦, 高橋 仁, 志賀拓也, 佐藤 勉, 中沢伸重, 岩野君夫; 醸協投稿中
- 8) 岩野君夫, 中沢伸重, 伊藤俊彦, 高橋仁, 上原泰樹, 松永隆司; 醸協, 96(12), 857-862 (2001)
- 9) 高橋仁, 伊藤俊彦, 中沢伸重, 岩野君夫; 醸協, 103(8), 638-645 (2008)
- 10) 統計解析ハンドブック (多変量編), 共立出版(株), 東京 (1995)
- 11) 岩野君夫, 伊藤俊彦, 長谷川恵美子, 高橋和弘, 中沢伸重; 醸協, 99(1), 55-63 (2004)
- 12) 布川弥太郎, 岩野君夫, 風間敬夫; 醸協, 71(8), 650-653 (1976)
- 13) 木崎康造, 小原昭, 逸見章則, 荒巻功, 小林信也, 岡崎直人; 醸協, 88(4), 326-331 (1993)
- 14) 高橋仁, 伊藤俊彦, 佐藤勉, 志賀拓也, 中沢伸重, 岩野君夫; 醸協, 103(11), 894-900 (2008)