清酒醪のアミノ酸減少に關与する胚芽中の無機成分

北本勝ひこ・三宅 優*・河野正義**・渡辺誠衛

高橋康次郎・戸塚 昭・中村欽一

(国税庁醸造試験所, * 現・広島国税局鑑定官室,

** 東京国税局鑑定官室)

昭和59年7月9日受理

Inorganic Components in Rice Germ Affecting Reduction of Amino Acid Content in Sake Moromi Mash

Study on the Brewing of Sake with Excellent Taste and Flavor (Part II)

Katsuhiko KITAMOTO, Masaru MIYAKE, Masayoshi KOHNO, Seiei WATANABE,

Kojiro TAKAHASHI, Akira TOTSUKA and Kin-ichi NAKAMURA

(National Research Institute of Brewing, 2-6-30 Takinogawa, Kita-ku, Tokyo 114)

Sake brewed by rice germ addition has less amino acid content. It suggests that rice germ contains factors promoting amino acid uptake by yeast.

The factors were isolated from rice germ, and were decided to be Mg^{2+} , K^{+} and PO_4^{3-} , the most effective combination of which was the addition of 0.3 m mole, 0.4 m mole and 0.2~0.4 m mole in 50 ml of brewing water, respectively. The sake brewed by this addition had a half amino acid content compared with that by no addition. Of these ions, Mg^{2+} was the most effective and its contribution ratio was calculated as 80.2%.

On the contrary, Ca^{2+} and Mn^{2+} inhibited amino acid uptake by yeast.

緒 言

前報¹⁾で、胚芽添加仕込を行った清酒では、通常の仕込酒と比べ、アミノ酸が約50%に減少し、*i*-AmOH, *i*-AmOAc等の香気成分が約2倍に増加すること、また酢酸、ピルビン酸の減少等の変化について報告した。

胚芽灰化物を用いた小仕込でも、アミノ酸の少い清酒が得られたので、胚芽灰化物中の無機成分から清酒醪中のアミノ酸減少に対する有効成分の検討を行った。さらに、各種無機イオンを添加した場合の酵母のアミノ酸取込量の変化から、アミノ酸減少に必要な無機イオンの量とその最適組合せについて検討した。

更に、得られた最適組合せによる総米200gの小仕込試験を行い、胚芽添加仕込酒と成分の比較を行った。

実 験 方 法

使用白米および胚芽 白米は胚芽が完全に除去され香味に特徴のある清酒の醸造に関する研究(第2報)

る精米歩合70%の日本晴を、胚芽は赤ヌカ中より32メッシュのふるいで分離したものを使用した。

使用酵母 協会7号および701号を使用した。

胚芽中の有効成分の検索 次の2種類の方法を用いた。

1) Fig.1に示すように10種類のアミノ酸を添加した合成培地(Yeast Nitrogen Base w/o amino acids,

S. cerevisiae (Kyokai-7) was preincubated in YM medium at 30°C, for 2 days

↓
Harvested by centrifugation and washed with water 2 times

↓
200 μ l of cell suspension was inoculated to 10 ml of YNB medium containing 10 kinds of amino acids* and each fraction

↓
incubated at 30°C, for 3 days

↓
amino acid content of the culture was determined by amino acid analyzer

Fig.1 Assay of the effective components in rice germ. (1)

* Glu, Gly, Ala, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Arg, Pro; 1 m mole each.

添加し、アミノ酸の減少に対する効果を調べた。Fig. 4 及び Fig. 6 に示すように、8種類の無機イオンのうち、 Mg^{2+} 、 PO_4^{3-} 及び K^+ の3種が必須であることが明らかとなった。一方、無機イオン単独の場合は、Fig. 5 に示したように、 Mg^{2+} 、 PO_4^{3-} 及び K^+ に効果が認められたが、胚芽、胚芽灰化物には及ばなかった。

なお、 Mn^{2+} 及び Ca^{2+} には、逆に醪中のアミノ酸量を増加させる効果が認められた。

以上、(1) 及び (2) の結果から、清酒、醪中のアミノ酸量を減少させる有効成分は、 Mg^{2+} 、 PO_4^{3-} 及び K^+ であり、これらのイオンが共存した場合に、最大の効果が認められることが明らかとなった。

2. アミノ酸の減少に対する無機イオンの最適濃度

アミノ酸を減少させる有効因子として、 Mg^{2+} 、 PO_4^{3-} 及び K^+ の3種が明らかとなったので、これらの最適濃度を検討した。

Fig. 6 に示すように、総米 40 g の小仕込において、

Fig. 5 Effect of inorganic ions on reduce of amino acid content in moromi.

Fig. 6 Effect of PO_4 , Mg and K addition on reduce of amino acid content in moromi.

Mg^{2+} 0.3 m mole, PO_4^{3-} 0.2~0.4 m mole 及び K^+ 0.4 m mole の添加の条件が、アミノ酸度を胚芽添加醪 (アミノ酸量 0.69 mg/ml) と同程度まで減少させることができた。

次に、3種のイオンの最適濃度で、2³の組合せにより総米 40 g の小仕込への添加試験を行い、その結果を Fig. 7 に示した。分散分析の結果、 Mg^{2+} が 1% 以下の、 PO_4^{3-} と K^+ が 5% 以下の危険率で醪中のアミノ酸の減少に対して有意となった。なお、寄与率は、 Mg^{2+} 80.2%, PO_4^{3-} 10.7%, K^+ 7.5% であった。

3. 無機イオン添加による小仕込試験

これらの無機イオンの効果を確認するため、総米 200 g の小仕込を行い、その製成酒の一般分析、香気成分の分析を行った。なお、同時に胚芽添加仕込みも行ったが、胚芽は脱脂後、蒸きょうせずに添加した。Table 3 に製成酒の一般分析値および香気成分分析結果を示す。3種のイオンの最適組合せである仕込 No. 4 は、アミノ

Fig. 7 Factorial effect of PO_4 , Mg and K on reduce of amino acid content in moromi.

*: Significance at 5% level.

**: Significance at 1% level.

Table 3 Analytical data for sake brewed by inorganic ion addition.

	Sake meter	Acidity	Amino acidity	Alcohol %	Color OD ⁴⁹⁰	PO_4 ppm	i-AmOH ppm	i-AmOAC ppm	E/A
No.1 Control	+3.0	2.2	1.34	17.8	0.037	75.1	243.5	2.36	0.97
No.2 Defatted rice germ 8g	+9.0	2.2	0.68	18.7	0.123	241.2	425.0	4.99	1.17
No.3 K 0m mole Mg 1.5m mole PO_4 1.5m mole	+1.0	2.3	0.96	17.3	0.038	87.2	235.9	5.82	2.47
No.4 2.0 " 1.5 " 1.5 "	+6.0	2.3	0.72	18.3	0.037	77.4	269.2	7.69	2.86
No.5 2.0 " 1.5 " 3.0 "	+4.5	2.3	0.90	18.4	0.036	136.8	266.7	6.15	2.31
No.6 2.0 " 2.0 " 1.5 "	+5.5	2.7	0.91	18.3	0.036	78.0	259.0	7.23	2.79

Table 4 Inorganic ion contents in brewing water. (ppm)

Used in many breweries	Used in Nada (Miyamizu)	Used in this experiment
K 0.10~58.0	19.69	312.8
Mg 0.20~33.04	5.61	145.8
PO ₄ 0.0 ~65.4	6.97	570.0

酸度が 0.72 と胚芽添加の仕込 No.2 の 0.68 とほぼ同じ値となり、対照の 1.34 の約 50% となった。香氣成分は、胚芽添加では、*i*-AmOH, *i*-AmOAc とともに対照の 2 倍となるため、E/A 比は変化しなかった。しかしながら、無機イオン添加では、*i*-AmOH は対照とほぼ等しいのに対し、*i*-AmOAc は約 3 倍に増加したため E/A 比も 2.5~3.0 倍に改善された。

無機イオン添加による製成酒は、胚芽添加製成酒の持つ着色度、ヌカ臭等の特異臭の問題点は解決され、エステル系の香りを持つ、淡れい辛口タイプであったが、多量の無機塩添加によると思われるが、後味にやや苦味が残った。

考 察

清酒醪中のアミノ酸減少に働く胚芽中の有効成分を、胚芽灰化物から抽出し、Mg²⁺、PO₄³⁻、K⁺ がその効果を有することを見出した。これらのイオンは、総米 40 g の小仕込試験でも、単独で効果が認められ、その最適濃度の組合せは、K⁺ 0.4 m mole (仕込水に換算すると 312.8 ppm), Mg²⁺ 0.3 m mole (同 145.8 ppm), PO₄³⁻ 0.2~0.4 m mole (同 380.0~760.0 ppm) の添加であった。この最適組合せ条件で総米 200 g の小仕込を行い、得た製成酒は胚芽添加と同様に対照酒の約 50% のアミノ酸量となった。

このアミノ酸を最も減少させる 3 種のイオンの最適濃度は Table 4 に示すように宮水の 15~80 倍の量となり、一般の酒造用水の最大値よりもはるかに多い量である⁴⁾。

難波ら⁵⁾ は、これら 3 種の無機イオンは原料米から主として供給され、その総量は酵母が発酵に必要とする量と比べ、K⁺ がやや不足気味であるが、Mg²⁺、PO₄³⁻ は十分であるとした。しかし、この値は蒸米中に含まれるこれらの無機イオンが全て溶出した場合であって、蒸米の溶解が完全に進んでいない醪前半では、Mg²⁺、PO₄³⁻ の溶出は K⁺ と比べ遅く、酵母の増殖の最も盛んな高泡時には欠乏すると考えられる。また、この時期は酵母によるアミノ酸の取込みの最も盛んな時期でもある⁶⁾。この点から、仕込水中の Mg²⁺、PO₄³⁻ の量は製成酒のアミノ酸量に大きく影響すると考えられる。

3 種のイオンのうち、アミノ酸減少に対する寄与率が

Table 5 Amount of amino acids derived from rice germ. mg/10g rice germ

	Difference I and II	I Koji	II Rice germ + Koji
Asp	28.8	16.8	45.6
Thr	12.1	27.9	40.0
Ser	11.5	13.8	25.3
Glu	5.5	19.1	24.6
Gly	12.1	7.7	19.8
Ala	21.6	16.7	38.3
Cys	1.6	5.9	7.5
Val	14.0	15.2	29.2
Met	3.0	7.7	10.7
Ile	8.7	11.0	19.7
Leu	9.2	25.5	34.7
Tyr	5.2	18.1	23.3
Phe	7.6	13.2	20.8
<i>r</i> -ABA	15.7	8.3	24.0
Orn	0.1	1.3	1.4
Lys	18.9	17.8	36.7
EtOHNH ₂	1.2	1.5	2.7
NH ₃	4.7	3.2	7.9
His	10.3	5.3	15.6
Trp	6.7	2.8	9.5
Arg	23.1	23.7	46.8
Pro	12.5	10.8	23.3
Total	234.2	272.9	507.1

After 60g of rice koji was incubated with and without 20g of rice germ at 55°C, for 14 hours, the filtrate was analysed by an amino acid analyzer.

80.2% と高い Mg²⁺ は、これまで硬度という概念から Ca²⁺ との合計量として扱われてきた。しかし、酵母によるアミノ酸の取込みという点からは、Ca²⁺ は明らかに阻害をするので、今後は両者を分けて扱うのが適当と思われる。

アミノ酸を増加させる因子として Ca²⁺、Mn²⁺ 及び他の実験結果⁹⁾から得られた Zn²⁺ があるが、これらは主として原料米から醪中へ溶出されると言われている⁷⁻⁸⁾。すなわち、アミノ酸取込の活発な醪前半に蒸米の溶解が早く進んだ場合には、これらのアミノ酸増加因子が働き、アミノ酸の多い清酒となると推察される。

なお、この胚芽中の有効成分の検索は、製成酒のアミノ酸量が、胚芽添加では対照酒の約 50% となることを指標として行った。しかし、胚芽 10 g から麴によって糖化 (55°C, 14 hrs) されたとき遊離するアミノ酸量は 234 mg (麴のみのブランクを引いた値) と計算される。(Table 5) すなわち、胚芽添加醪では、対照と比べ多量のアミノ酸が供給される。それにもかかわらず、10 g の胚芽を添加した仕込酒 (アミノ酸総量 529 mg) は対照酒 (1,050 mg) に比べ 521 mg 少くなる¹⁾。胚芽添加では、発酵中に酵母が取込むアミノ酸量は、胚芽の持ち込みのアミノ酸をも取込んで対照酒の約 50% とするのに対し、無機イオン添加仕込では持ち込みはなく取込量は少くてよい。アミノ酸取込量が少いことは、Leu を取込ん

で生成する i -AmOH 含量が対照とほぼ同じであるのに対し、胚芽添加では約 2 倍となっていること (Table 3) からもその違いが明らかである。これは、灰化によって失われた有効成分が存在する可能性を示唆する。この点については今後、検討する予定である。

要 約

胚芽添加仕込みにより、製成酒のアミノ酸度、酸度が減少し、香気成分が増加する。

そこで、胚芽中の有効成分をアミノ酸の減少を指標として調べ、下記の結果を得た。

1. 灰化胚芽にも同様な効果が認められたので、胚芽中に含まれる無機成分の組合せの添加試験を行い、 Mg^{2+} 、 PO_4^{3-} 、 K^+ の 3 種が必要であることを明らかにした。
2. 多元配置法により、これら 3 種の主効果が認められ、その寄与率は Mg^{2+} 80.2%、 PO_4^{3-} 10.7%、 K^+ 7.5% と計算された。
3. これら 3 種の添加量の最適組合せは、汲水 50 ml 当り Mg^{2+} 0.3 m mole、 PO_4^{3-} 0.2~0.4 m mole、 K^+ 0.4 m mole であった。

4. この最適組合せの添加試験を総米 200 g の小仕込みで行った。製成酒のアミノ酸度は、無添加の対照が 1.34 に対し、0.72 と約半分となった。

5. Mg^{2+} 、 PO_4^{3-} 、 K^+ は酵母のアミノ酸取込みに対し促進作用を示すが、反対に Ca^{2+} 、 Mn^{2+} は阻害作用を示した。

終りに、御校閲頂いた醸造試験所所長、佐藤信博士および第 6 研究室長吉沢淑博士に感謝いたします。

文 献

- 1) 北本勝ひこ、三宅 優、渡辺誠衛、中村欽一：醸協 80 (1) 53 (1985)
- 2) B. J. Allen: *Biochem. J.* 34 858 (1940)
- 3) S. Moore and W. H. Stein: *J. Biol. Chem.* 176 367 (1948)
- 4) 難波康之祐、百瀬洋夫、大場俊輝編：清酒製造技術 p. 45 日本醸造協会 (1979)
- 5) 難波康之祐、戸塚 昭、伊藤 清、小野一幸：醸協 72 (12) 893 (1977)
- 6) 未発表
- 7) 前川季義：醸協 73 (2) 140 (1978)
- 8) 難波康之祐、大場俊輝、高橋康次郎、森 千博、佐藤 信：醸協 73 (12) 975 (1978)