

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07820

研究課題名（和文）高温障害米及び難消化性醸造残渣の消化補助酵素に関する検討

研究課題名（英文）Investigation resistant starch digestive enzyme for high temperature matured rice.

研究代表者

伊藤 俊彦 (Ito, Toshihiko)

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：50336442

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：A. luchuensisが生成するグルコアミラーゼは、生デンプン結合ドメインを有するグルコアミラーゼの働きにより超高アミロース米を消化することを明らかにした。また、難消化性米を原料米とし、A. oryzaeで作成した麹は超高アミロース米を消化することを明らかにした。さらに、A. oryzaeが生成する難消化性デンプン分解酵素は、 $\alpha$ -アミラーゼ及びグルコアミラーゼであることを明らかにした。しかし、グルコアミラーゼはpIの異なる3種の酵素が見出されており、これらの詳細な検討は今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昨今の地球温暖化により、稲の登熟期の気温が下がらず、高温登熟障害米の出現頻度が高くなっている。この高温登熟障害米は澱粉の構造であるアミロペクチン鎖が長くなる傾向がある。この現象は酵素による消化を受けにくい、難消化性を示し、酒造現場では酒化率の低下を招くことになり、収益の減少へとつながる。本研究で用いている超高アミロース米は、高温登熟障害米の特徴が顕著に表れたものであり、この超高アミロース米を消化する技術は高温登熟障害米の消化技術に応用することが可能である。

研究成果の概要（英文）：Glucoamylase produced by *Aspergillus luchuensis* is elucidated to digest ultra-high amylose rice, due to the activity of glucoamylase, which has a raw starch binding domain. Furthermore, it was clarified that the koji prepared by *A. oryzae*, which uses ultra-high amylose rice is digests ultra-high amylose rice. And, it was revealed that the degrading enzymes for ultra-high amylose rice produced by *A. oryzae* are  $\alpha$ -amylase and three types glucoamylases.

研究分野：醸造学

キーワード：難消化性米 超高アミロース米 難消化性澱粉分解酵素

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

清酒は米・米麴により製造するが、米の溶けは酒化率(原料米が清酒になる割合)に直接影響し、清酒製造業者の利益を左右する。

昨今の温暖化の影響により問題となっている「高温登熟障害米」は、麴由来のデンプン分解酵素では溶けが悪く、酒化率が低下することが問題となっている。「高温登熟障害米」が溶けにくい理由として構成成分が異常なデンプン蓄積が考えられる。実際に高温登熟障害が原因で溶けが悪かった原料米のデンプンを解析するとアミロペクチン側鎖長の伸長が認められた (Fig. 1)。原料米の高温登熟障害は

一部の水田の問題では無く、広域で同時に起こる問題であることから、高温障害による難溶解性の原料米を溶解し、原料米を有効に利用する技術の開発は非常に有益であると考え。我々は、米澱粉の生合成に関与する酵素が壊れた変異体を多数保有しており、これらが、通常の米とは異なる成分、構造、性質を示すことを明らかにしてきた(藤田, 2011, 応用糖質科学)。我々が持っている変異体の中には、澱粉の性質の変化が非常にダイナミックなものを含んでおり、アミロース含量が通常の酒米の2倍以上高い品種が存在する。これら、超高アミロース米を用いた麴を使用し以下に示す知見を得た。

(1)変異体米は、超高アミロースであるため、難消化性澱粉を多く含み、通常の麴菌が発現する澱粉分解酵素では分解されにくい。

(2)この変異体米を用いて製麴した場合、澱粉分解酵素等の活性が極めて高い麴ができることを確認した。これは、麴菌が自らの生存のために通常は発現しない量あるいは質の澱粉分解酵素を発現するようになっているためと推測できる。

(3)使用する麴の菌株の違いで変異体由来の難消化性澱粉の分解度合いが異なる。白麴は(焼酎用麴)を用いると、消化が良かった。

このような変異米は非常に高い難溶解性を示すと共に、同変異体米を原料として使用した麴を用いた醪では非常に高い溶解性を示した(未発表データ)。特に、焼酎製造に用いられる白麴菌 (*Aspergillus kawachii*) を用いた際には、デンプン分解の主要酵素である  $\alpha$ -アミラーゼ活性が低いにも関わらず非常に高い消化性を示した。

(4)この難消化性澱粉等の分解が可能な麴(以後、変異体米麴とする)を用いて酒粕を消化させた場合、アミノ酸のうち、うまみ成分が多く放出されることが分かった。この変異米と白麴菌の組み合わせで製麴した際に発現している酵素を明らかにすることが、難消化性デンプンを溶解するメカニズムの解明に寄与するものと考えられる。これらの知見は、高温登熟障害米の醸造手法の開発や補助剤としての酵素剤開発に繋がり、今後更に増えることが予想される高温登熟障害米の清酒製造技術に寄与できるものと考えられる。

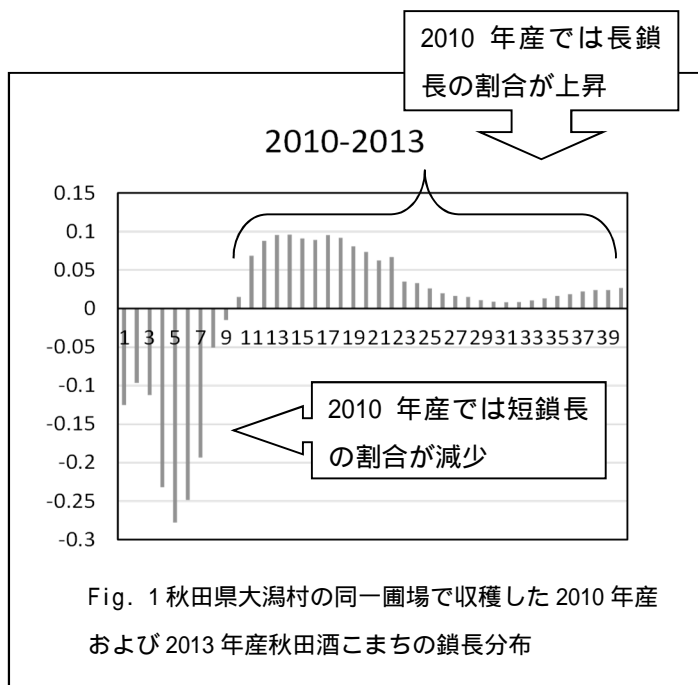


Fig. 1 秋田県大潟村の同一圃場で収穫した 2010 年産および 2013 年産秋田酒こまちの鎖長分布

## 2. 研究の目的

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。清酒では米を原料とした米麹が用いられ、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、清酒に独特の風味を付与している。また、麹菌は生育する環境に応じて数多くの酵素を誘導発現することが知られている。本研究では難消化性を示す超高アミロース米を原料とした麹を開発し、その性質や利用方を検討する。現在までの研究において超高アミロース米を原料とした麹は難消化米性である超高アミロース米を可溶化することが分かっている。そこで、難消化性米を可溶化する酵素を明らかにするとともに高温障害米対策の添加酵素など新規利用法の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)原料米

使用した原料米は、コントロールを含む澱粉の構造、性質が極端に異なる以下の3種類を持ちいた。

秋田酒こまち：通常、日本酒製造に使用される酒米、コントロールとして使用する。

日本晴：変異体米の野生型に相当する品種（アミロース含量約20%）

超高アミロース米：SSと枝作り酵素(BE)の二重変異体（アミロース含量約45%）

### (2)精米

清酒製造には、通常、70%以下に精米した米が使用される。そこで、原料米チヨダ醸造用精米機(HS-4)を用いて、重量換算で70%まで精米した。

### (3)製麹

変異米のデンプン消化に適した麹菌の選抜するために、酒造用麹菌の他、焼酎用麹菌及び研究室保有の自然突然変異株を用いて製麹を行った。この際、製麹は780 ml容のタッパーウェアを用い、原料米100gに対して種麹を0.1%散布した。その後、エスベック社製の恒温恒湿機(PR-1PK)を用いて、31℃、湿度90%にて20hr保持した後手入れを行い、その後38℃、湿度85%として24hr保持した後に出麹とした。

### (4)麹の酵素活性測定

麹に対し、5倍量のNaCl入りの酢酸緩衝液(10mM, pH 5.0)を用いて酵素液を抽出し、これらのα-アミラーゼ活性、グルコアミラーゼ活性、ペプチダーゼ活性を測定した。尚、酵素活性測定にはキッコマンバイオケミファ社製、醸造分析キットを用いた。

### (5)麹酵素による難消化性デンプン消化能評価

難消化性米である変異米を糖化した後に、*A. oryzae*由来のα-アミラーゼ及びグルコアミラーゼにて処理した。その後、残渣を回収し凍結乾燥及び粉碎処理したものを基質とした難消化性澱粉分解酵素活性(以下RSDEとする)測定法を設定した。

### (6)難消化性デンプン消化酵素の精製と推定

上述の評価方法を利用し、各種クロマトグラフィーを用いて酵素精製を行った。また、消化性の良い酒造好適米と難消化性である変異米を麹米とした際に生成する酵素タンパク質の差異を2D-PAGEを用いて分析すると共に、LC-MS/MSによる酵素の同定を試みた。

### (7)高温登熟障害米を用いた清酒の試験醸造

高温登熟障害米を用いて小スケールでの清酒仕込試験を行った。この際、難消化性デンプン分解酵素(白麹由来グルコアミラーゼ)添加区と*A. oryzae*由来のグルコアミラーゼ添加区との各種成分比較を行い、難消化性デンプン分解酵素の有益性を確認した。

## 4. 研究成果

### (1) 難消化性澱粉分解酵素 (RSDE) の特定

変異体米を原料とした麴より抽出した酵素を陰イオンクロマトグラフィー、陽イオンクロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーを用いて SDS-PAGE 上で単一となるまで精製した。その結果、難消化性澱粉分解にはグルコアミラーゼ活性を有する画分と  $\alpha$ -アミラーゼ活性を有する画分が関与していることが明らかになった (Fig. 2)。そこで、これら活性画分の同定を試みた。 $\alpha$ -アミラーゼ活性画分は SDS-PAGE を行った後、PVDF 膜に転写し、ペプチドシーケンサーにて N 末端アミノ酸配列 20 残基を決定した。グルコアミラーゼ活性画分は精製不十分であった為、2D-PAGE を行った後、LC-MS/MS 分析により同定した。この結果、難消化性澱粉分解にはグルカン-1, 4- $\beta$ -グルコシダーゼ及びタカアミラーゼ A が相互に関与していることが明らかになった。しかし、今回同定したグルカン-1, 4- $\beta$ -グルコシダーゼは 2D-PAGE において pI の異なる 3 種 (Fig. 3) が検出されており、更なる検討が必要である。

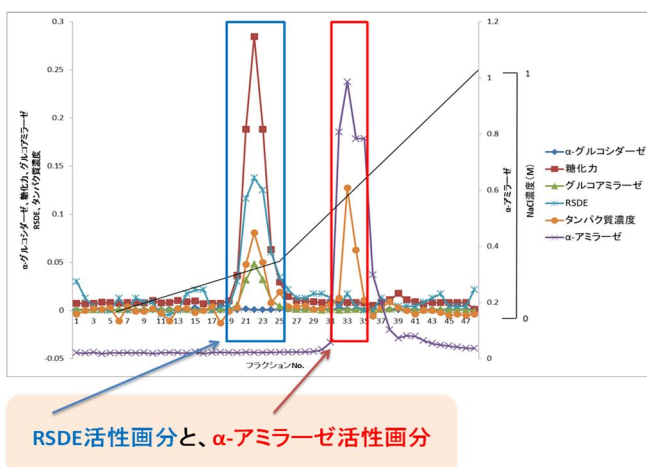


Fig. 2 陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製

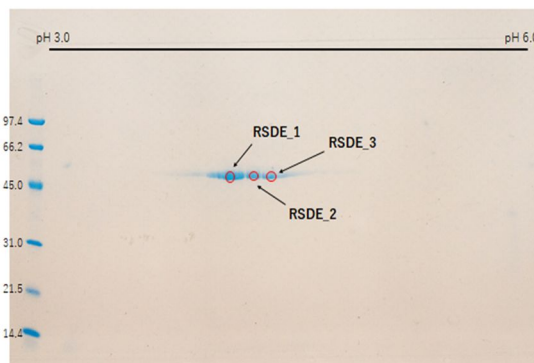


Fig. 3 精製 RSDE 画分の 2D-PAGE

### (2) 高温登熟障害米を用いた清酒の試験醸造

2010 年産秋田酒こまち (高温登熟障害米の傾向が顕著に確認された米) を原料米として、白麴菌由来のグルコアミラーゼが有する難消化性澱粉分解酵素の有用性を確認した。この結果、Fig. 4 に示した通り発酵の度合いを示す炭酸ガス減量において白麴菌由来のグルコアミラーゼ添加区において明らかな発酵速度の上昇が示された。また、この差異は発酵後期に顕著になることから、白麴菌由来のグルコアミラーゼが難消化性澱粉を消化していることが推察できた。

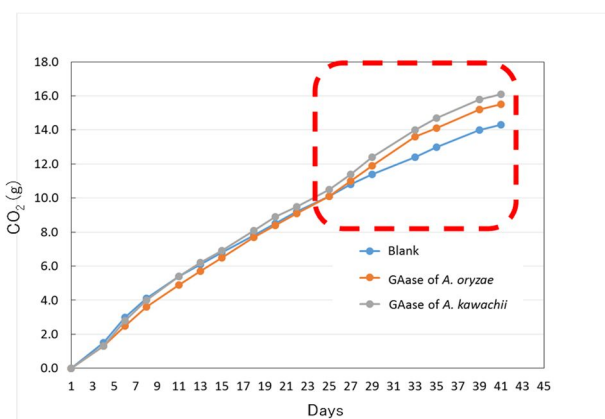


Fig. 4 白麴菌由来のグルコアミラーゼを添加した高温登熟障害米の小仕込試験

以上の結果より、超高アミロース変異体米は高温登熟障害米の極端なモデル米として利用が可能であることが示された。また、本変異体米を原料米として用いた *A. oryzae* が生成するデン

ブン分解酵素及び、白麹菌が生成する生デンプン消化能力有するグルコアミラーゼは高温登熟障害米発生時の消化補助剤として利用可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>伊藤俊彦, 大阪朝美, 広幡千紘, 藤田直子, 橋爪克己 | 4. 巻<br>5             |
| 2. 論文標題<br>難消化性澱粉分解酵素生産系状菌の探索          | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>秋田県立大学ウェブジャーナルB              | 6. 最初と最後の頁<br>126-130 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし         | 査読の有無<br>無            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著<br>-             |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>伊藤俊彦, 藤原淳一, 野口巧実, 藤田直子, 橋爪克己 | 4. 巻<br>4             |
| 2. 論文標題<br>難消化性米が清酒醸造へ及ぼす影響            | 5. 発行年<br>2017年       |
| 3. 雑誌名<br>秋田県立大学ウェブジャーナルB              | 6. 最初と最後の頁<br>125-130 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし         | 査読の有無<br>無            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>伊藤俊彦, 白井俊晴, 藤田直子, 橋爪克己       |
| 2. 発表標題<br>黄麹菌が生産する難消化性澱粉分解酵素の探索およびその応用 |
| 3. 学会等名<br>日本生物工学会                      |
| 4. 発表年<br>2019年                         |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>伊藤俊彦, 笹淵優衣, 藤田直子, 橋爪克己    |
| 2. 発表標題<br>黄麹菌が生産する難消化性澱粉分解酵素の探索 第2報 |
| 3. 学会等名<br>日本生物工学会                   |
| 4. 発表年<br>2018年                      |

|                                  |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>伊藤俊彦、広幡千紘、藤田直子、橋爪克己   |
| 2. 発表標題<br>黄麹菌が生産する難消化性澱粉分解酵素の探索 |
| 3. 学会等名<br>日本生物工学会               |
| 4. 発表年<br>2017年                  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                | 備考 |
|-------|--|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 橋爪 克己<br><br>(Hashizume Katsumi)<br><br>(30372189) | 秋田県立大学・生物資源科学部・教授<br><br><br>(21401) |    |
| 研究分担者 | 藤田 直子<br><br>(Fujita Naoko)<br><br>(90315599)      | 秋田県立大学・生物資源科学部・教授<br><br><br>(21401) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|