

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450181

研究課題名(和文) 清酒の疎水性呈味成分の意義及び生成機構の解明

研究課題名(英文) Studies on roles and formation mechanisms of taste-active hydrophobic compounds in sake.

研究代表者

橋爪 克己 (Hashizume, Katsumi)

秋田県立大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：30372189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：清酒のフェルラ酸(FA)とフェルラ酸エチル(FE)の清酒もろみ条件下における生成機構を検討し、清酒中のこれら成分のレベル変動要因を明らかにした。また、清酒醸造過程におけるこれら成分の生成レベル(とりわけFE/FA比)に黄麹菌が生産するフェルロイルオリゴ糖生成酵素が重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに、清酒中の呈味性ピログルタミルデカペプチドエチルエステル(PGDPE)の新規で正確な定量法(SIDA法)を確立するとともに、清酒中の閾値を推定した。これらの検討からPGDPEが清酒の味わいに深く関わっていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Forming mechanisms of ferulic acid (FA) and ethyl ferulate (FE) under sake mash conditions were studied, and affecting factors of these compound levels in the sake were elucidated. It was also found that feruloylated oligosaccharide forming enzyme(s) from *Aspergillus oryzae* may play a crucial role in the forming levels of FE and FA (especially FE/FA ratio) in the sake brewing process. A new accurate quantitation method for taste-active pyroglutamyl decapeptide ethyl esters (PGDPEs) in sake was developed by using a SIDA method, and then thresholds of PGDPEs in the sake were estimated. The results revealed that PGDPEs may play significant sensory roles in the sake taste.

研究分野：醸造学

キーワード：清酒 疎水性呈味成分 フェルラ酸 フェルラ酸エチル エチルエステル化ペプチド ピログルタミル
デカペプチドエチルエステル

1. 研究開始当初の背景

清酒の消費量が逡減する中、米粒の外層部を50%以上削り取った原料米で造る大吟醸酒が上品な味わいを理由に国内・外市場の支持を得ている。しかしながら、原料米の高度精白には長い時間と電力を要し、また、吟醸造りは大量の酒粕を副産する。この原料利用率が著しく低い醸造法によって清酒の品質が飛躍的に向上する理由は未だ十分に解明されていない。原料米の利用率を重視した一般の清酒醸造では強い苦味・渋味が問題となるため、原因成分の研究は古くから行われてきたが、これまでに見出された成分のうち味わいへの関与が確実なものは、アルギニンなどの数種のアミノ酸、芳香族アルコールや苦味ペプチドのみであった。その後、本研究課題遂行者らは、清酒の疎水性呈味成分であるフェルラ酸が強い苦味・渋味を呈し、フェルラ酸エチルとエチルエステル化ペプチドが甘味を伴った好ましい呈味を示すことを見出したが、これら成分の清酒醸造における意義及び生成機構は未解明であった。

2. 研究の目的

本研究では、清酒もろみにおいてフェルラ酸 (FA) を中心とするフェノール酸の生成レベルに影響を及ぼすことが推定された原料白米のフェノール酸含有量、黄麹菌が生産するフェルロイルエステラーゼなどの酵素等の要因が清酒醸造過程でどのように関与しているのかを明らかにすること、清酒もろみの蒸米溶解過程でフェルラ酸エチル (FE) / フェルラ酸 (FA) の生成比率に影響を及ぼす要因を明らかにすること、清酒中に低濃度に存在する米胚乳貯蔵タンパク質グルテリンのN末端配列に由来するエチルエステル化ペプチドの官能特性 (閾値等) を明らかにすること、さらに、清酒醸造過程におけるエチルエステル化ペプチドのレベル変動要因を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 品種及び精米歩合が異なる白米試料のフェノール酸含有量を測定するとともに、当該白米を用いて蒸米及び米麹を調製し、米麹の酵素が清酒もろみ条件下で蒸米からのフェノール酸の遊離に及ぼす影響、白米中のFA含有量が米麹製造過程における酵素生産に及ぼす影響を調べた。

(2) 白米から酵素剤を用いてフェルロイルオリゴ糖を調製し、フェルロイルオリゴ糖及びフェルラ酸の各種アルキルエステルを基質として清酒もろみ条件下におけるFA及びFE生成酵素反応を調べた。

(3) 清酒中に見出された2つのエチルエステル化ペプチド (ピログルタミルデカペプチドエチルエステル: PGDPE1 及び PGDPE2) を合成し、清酒中における呈味特性を調べた。

(4) 清酒中のPGDPEレベルを正確に定量するため重水素置換した同位体を合成し、新規な安定同位体希釈分析法 (SIDA法) を開発した。この方法を用いて製造方法などが異なる市販清酒試料を分析し、PGDPEのレベル変動に關与する要因を検討した。

4. 研究成果

(1) 品種と精米歩合が異なる清酒原料米のフェノール酸含有量を測定した結果、調べた5品種 (山田錦、五百万石、美山錦、雄町、秋田酒こまち) すべてにおいて、精米の進行とともに精米歩合50%に至るまで原料米のFA含有量は低下し、原料米として評価の高い山田錦や秋田酒こまちは全ての精米歩合で低いFAレベルを示すことを見出した。さらにこれら原料米を蒸米として麹酵素による消化試験を行った結果、清酒もろみ条件下における蒸米からのFAの遊離には、フェルロイルエステラーゼが深く関与することを見出した。また、製麹過程において原料米のFAレベルに応じてフェルロイルエステラーゼ活性が誘導されることを見出した。さらに、麹製造が終了した時点でフェルロイルエステラーゼの作用により米麹中には遊離のFAが生成しており、そのレベルは白米の総FA含有量とよく一致していることを見出した。これらの検討過程でFAの一部は黄麹菌によってバニリン酸に変換され、さらに麹製造環境に棲息するバチルス属及びスタフィロコッカス属の汚染細菌によってバニリン酸の一部が代謝変換され、強力な異臭成分であるグアイアコールが生成することを見出した。

(2) 清酒原料米からFAが生成する際の中間体と推定されるフェルロイルオリゴ糖を、原料白米から酵素剤を用いて調製し、このフェルロイルオリゴ糖とFAの各種アルキルエステルを基質として清酒もろみを擬した条件下で麹酵素による反応を検討した結果、フェルロイルオリゴ糖がFAアルキルエステルよりも良好な被加水分解基質であることが明らかとなった。また、フェルロイルエステラーゼはフェルロイルオリゴ糖からフェルロイル基を結合した反応中間体を形成し、その中間体を經由して加水分解反応とエステル転移反応が競争的に進行することが推定された (図1)。この反応においてFAとFEが生成する比率は反応液のエタノール濃度に一義的に依存したことから、清酒中のFE/FA比は、清酒もろみのアルコール濃度によって決定されることが明らかとなった。さらに、清酒もろみ条件下で、フェルロイルエステラーゼの良好な基質となるフェルロイルオリゴ糖を生成する酵素活性測定のための新規な手法を開発し、この過程を律速する酵素の検討に着手し、酵素剤中から当該酵素の精製標品を得た。

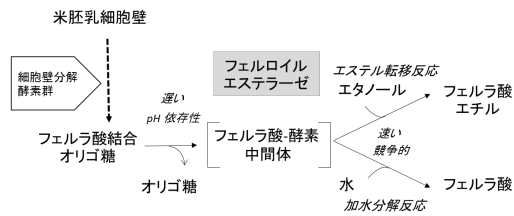


図1 清酒もろみにおけるフェルラ酸及びフェルラ酸エチルの推定生成機構

(3) 清酒中に見出された 2 種類のピログルタミンルデカペプチドエチルエステル PGDPE [PGDP1 ; (pGlu)LFGPNVNPWCOOC₂H₅ 及び PGDPE2; (pGlu)LFNPTNPWCOOC₂H₅] を、N 末端がピログルタミン基の 10 アミノ酸残基からなるペプチドの C 末端カルボキシ基をエチルエステル化することにより合成した。当該ペプチドをエタノール・水系の HPLC により精製し、官能評価に使用できる標品を調製した。PGDPE を含まない清酒に添加し、11 名のパネルにより極限法 (上昇系列) の強制選択変法により閾値を推定した。その結果、PGDPE1 の認知閾値は 3.8 µg/L、PGDPE2 のそれは 8.1 µg/L と推定された。これらの値はアミノ酸配列が類似した清酒の苦味ペプチド (11~13 アミノ酸残基からなり N 末端はピログルタミン基、C 末端はカルボキシ基) と比較して 10 倍程度低かった。これら PGDPE の味わいについては約半数が苦味・渋味を感じ好ましくないと評価したのに対し、約半数は清酒らしいまろやかさを感じる好ましい味わいと評価した。

(4) 上記と同様の手法で重水素ラベルしたエタノールを用いて PGDPE 標品を合成し、これを内部標準物質として試料に添加し、高分解能 MS で検出する、精度が高い安定同位体希釈分析法 (SIDA 法) を確立した。この定量法により製造方法が異なる各種市販清酒試料 18 点の PGDPE レベルを測定したところ、PGDPE1 の最大濃度は 27 µg/L、PGDPE2 のそれは 202 µg/L であった。これらの値は、(3) で推定した認知閾値を十分に上回ったことから、PGDPE が清酒の呈味に深く関与していること明らかとなった (図 2)。

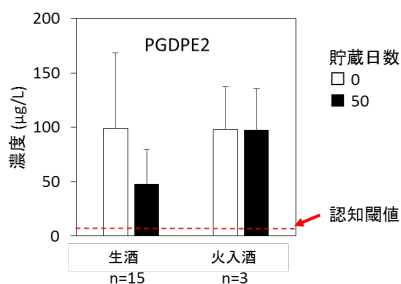


図2 市販清酒のPGDPE2濃度と認知閾値

加熱処理の有無により試料を分けて低温貯蔵後の濃度変化を調べた結果、生酒では日数

の経過に伴い PGDPE レベルの低下が見られ、清酒中に残存する酵素によって PGDPE は分解されることが明らかとなった。これらの検討を行う過程で、PGDPE は黄麹菌が生産する酵素反応によって生成することを見出し、反応生成物を SIDA 法により定量する新規酵素活性測定法を開発し、清酒醸造過程における PGDPE 生成機構を検討した。

まとめ

以上の検討から清酒の味わいと抗酸化性に重要な役割を果たす FA と FE の清酒醸造過程における生成機構とレベル変動要因に関する知見を得ることができた。これら成分のレベル制御 (とりわけ FE/FA 比) には黄麹菌が生産するフェルロイルオリゴ糖生成酵素が重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、清酒醸造過程でフェルラ酸から生成したバニリン酸が汚染微生物によるグアイアコール生成の前駆体となり得ることを見出した。さらに、清酒中に低濃度に存在する米胚乳貯蔵タンパク質グルテリンの N 末端由来の呈味性エチルエステル化ペプチド (PGDPE) の正確な定量法 (SIDA 法) を確立するとともに清酒中の閾値等を推定し、PGDPE が清酒の味わいに確実に関わっていることを明らかにした。この SIDA 法を利用した PGDPE を生成する米麹の新規酵素活性測定法を開発し、PGDPE 生成機構を検討した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Quantitation using a Stable Isotope Dilution Assay (SIDA) and Thresholds of Taste-Active Pyroglutamyl Decapeptide Ethyl Esters (PGDPEs) in Sake. Katsumi Hashizume, Toshihiko Ito, and Shinya Igarashi. Biosci. Biotechnol. Biochem. 81, 426-430 (2017) [査読あり]

Doi: 10.1080/09168451.2016.1259554

Formation of guaiacol by spoilage bacteria from vanillic acid, a product of rice koji cultivation, in Japanese sake brewing. Toshihiko Ito, Mahito Konno, Yoichiro Shimura, Seiei Watanabe, Hitoshi Takahashi, and Katsumi Hashizume J. Agric. Food Chem. 64, 4599-4605 (2016) [査読あり]

Doi: 10.1021/acs.jafc.6b01031

Formation of ethyl ferulate from feruloylated oligosaccharide by transesterification of rice koji enzyme under sake mash conditions. Suzuki, N., Ito, T., Hiroshima, K., Tokiwano, T, and Hashizume, K. J. Biosci. Bioeng. 121, 281-285 (2016) [査読あり]

Doi:10.1016/j.jbiosc.2015.06.015

清酒と原料米のフェノール酸関連化合物
橋爪克己 日本醸造協会誌 110(1)2-7
(2015) [査読なし]

Factors affecting phenolic acid liberation from rice grains in the sake brewing process. Ito, T., Suzuki, N., Nakayama, A., Ito, M, and Hashizume, K. J. Biosci. Bioeng. 118, 640-645 (2014) [査読あり]

Doi:10.1016/j.jbiosc.2014.05.013

[学会発表](計 4 件)

橋爪克己、五十嵐信也、高橋樹、伊藤俊彦、清酒中の呈味性ピログルタミンルデカペプチドエチルエステル (PGDPEs) の安定同位体希釈分析 (SIDA) 法による定量と閾値 (一般講演) 日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 19 日、京都女子大学 (京都府京都市)

橋爪克己、伊藤俊彦、清酒中の苦味成分に関する研究 (日本醸造協会技術賞受賞講演) 平成 28 年度日本醸造学会、2016 年 10 月 19 日、北とぴあ (東京都北区)

今野真人、伊藤俊彦、志村洋一郎、渡邊誠衛、高橋仁、橋爪克己、清酒醸造におけるグアイアコール(4-VG 様フェノール臭原因物質)の生成(一般講演) 日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 30 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

鈴木伸和、廣嶋魁、高野康人、伊藤俊彦、橋爪克己、清酒のフェルラ酸およびフェルラ酸エチルレベルの変動要因について (一般講演) 日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学 (岡山県岡山市)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋爪 克己 (Hashizume, Katsumi)
秋田県立大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：30372189

(2) 研究分担者

伊藤 俊彦 (Ito, Toshihiko)
秋田県立大学・生物資源科学部・助教
研究者番号：50336442

(3) 連携研究者

奥田 将生 (Okuda, Masaki)
独立行政法人酒類総合研究所・主任研究員
研究者番号：80372192